PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, A. ERNST-ZÜRICH, H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, W. SCHUMACHER-BONN, G. TISCHLER-KIEL

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND OTTO RENNER

38. BAND, 5. HEFT

MIT 44 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 28. NOVEMBER 1950)

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1950

Planta (Berl.)

Preis DMark 18.60

Die Zeitschrift

Planta

Archiv für wissenschaftliche Botanik

steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden so bald als möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften; mit 40—50 Bogen wird ein Band abgeschlossen.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DMark 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DMark 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht, und zwar bis zum 31. Dezember desjenigen Kalenderjahres, das auf das Jahr des Erscheinens folgt. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig innerhalb dieses Zeitraumes zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe III. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (13a) *Erlangen, Botanisches Institut der Universität* oder an

Professor Dr. Otto Renner, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzingerstraße 67.*

Springer-Verlag

Berlin-Charlottenburg 2, Jebensstr. 1, Fernsprecher 322070
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440.

Vertriebs-Vertretungen im Ausland:

Schweiz . . . . . Lange, Maxwell & Springer A.G., Schützenmattstr. 43, Basel

England, USA. und übriges Ausland Lange, Maxwell & Springer Ltd., 41—45 Neal Street, London, W.C.2

38. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 5. Heft.

Seite

Bünning, Erwin, Über die photophile und skotophile Phase der endogenen Tagesrhythmik. Mit 6 Textabbildungen 521

Bringmann, Gottfried, Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oszillatorien. Mit 24 Textabbildungen 541

Kandler, Otto, Versuche zur Kultur isolierten Pflanzengewebes in vitro. Mit 9 Textabbildungen 564

Kaussmann, Bernhard, Beiträge zur Morphologie von *Phyllanthus Niruri* L. Mit 2 Textabbildungen 586

Linskens, H. F., Quantitative Bestimmung der Benetzbarkeit von Blattoberflächen. Mit 3 Textabbildungen 591

Kurze Mitteilungen:

Seybold, A., Chromatographie der Blattfarbstoffe. (Eine Erwiderung.) . . . 601

Wendel, Kurt, Chromatographie der Blattfarbstoffe. (Stellungnahme zu vorstehender Erwiderung.) 603

Planta, Bd. 38, S. 521—540 (1950).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen*.

ÜBER DIE PHOTOPHILE UND SKOTOPHILE PHASE DER ENDOGENEN TAGESRHYTHMIK.

Von

ERWIN BÜNNING.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Juni 1950.)

Einleitung.

Die endogene Tagesrhythmik der Pflanzen besteht bekanntlich in dem physiologisch selbstgesteuerten regelmäßigen Wechseln zweier Phasen, die sich unter anderem biochemisch durch unterschiedliche Stoffwechselleistungen, Fermentaktivitäten usw. unterscheiden. Das darf jetzt als eine von mehreren Autoren bestätigte Tatsache angesehen werden (vgl. z. B. BÜNNING 1942, 1944; HARDER 1949; sowie zahlreiche russische Veröffentlichungen, die ich 1944 zitiert habe).

Eine Tatsache ist es fernerhin, daß dieser biochemischen Verschiedenheit auch eine reizphysiologische entspricht: Die eine Phase ist hinsichtlich der photoperiodischen Förderung der Blütenbildung photophil, die andere skotophil. (Um vorsichtig zu sein: es wäre auch denkbar, daß bei einigen Langtagpflanzen der Unterschied zwischen den beiden Phasen nur darin besteht, daß die eine stärker, die andere schwächer photophil, oder indifferent ist.)

Nach der Feststellung dieser Tatsachen bleiben noch mehrere Probleme: *Warum* wirkt das Licht in den beiden Phasen qualitativ verschiedenartig, und worin besteht die Lichtwirkung? Diese Fragen sind eng mit dem weiteren Studium der biochemischen Eigentümlichkeiten von photophiler und skotophiler Phase verknüpft. Ferner: Sind beim Photoperiodismus noch andersartige Lichteinflüsse wirksam als jene hemmenden und fördernden? Das heißt, genügen die ermittelten Tatsachen prinzipiell zur Erklärung der photoperiodischen Erscheinungen, oder sind noch wesentlich andere Lichtwirkungen im Spiel?

Eine weitere Frage, deren Beantwortung aber zum Verständnis des Photoperiodismus auf der Grundlage der endogenen Tagesrhythmik nicht entscheidend ist, besteht darin, ob die photophile Phase immer

* Ein großer Teil der Versuche wurde im Department of Botany, Panjab-University, Lahore (Pakistan) durchgeführt. Dem Direktor, Prof. SHER AHMED LODHI, danke ich für alle Hilfe, besonders für die schnelle Einrichtung einer Dunkelkammer. Der in Tübingen durchgeführte Teil der Untersuchungen wurde durch die „Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft" unterstützt.

an einer Hebung der Laubblätter, die skotophile an deren Senkung erkennbar ist. Gelegentlich ist der Irrtum aufgetreten, ich hätte die photophile Phase als die der Blatthebung, die skotophile als die der Blattsenkung definiert. Es ist, wie ich von Anfang an betonte, eine Angelegenheit weiterer Beobachtungen, festzustellen, ob die allein durch die Art der photoperiodischen Empfindlichkeit charakterisierten Phasen immer am Verlauf der Blattbewegungen erkennbar sind.

1. Ermittlung des Verlaufs der beiden Phasen aus dem bisher vorliegenden Tatsachenmaterial.

Bevor die obengenannten Fragen weiter beantwortet werden können, ist es notwendig, den Verlauf der photophilen und skotophilen Phase so genau wie möglich zu ermitteln. Das ist natürlich auf Grund eines Studiums der Blattbewegungen nicht einwandfrei möglich, weil wir eben nicht wissen, wie genau und wie schnell die Blattbewegungen dem Wechsel von photophiler und skotophiler Phase folgen. Zudem wirkt, wie wir seit langem wissen, nicht nur die endogene Tagesrhythmik auf die Blattbewegungen, sondern es treten thermonastische und photonastische Beeinflussungen, auch Erscheinungen wie der „Tagesschlaf" hinzu.

Bisher kennen wir wohl für einige Pflanzen auf Grund der Analyse der photoperiodischen Gesetzmäßigkeiten einigermaßen den Verlauf von photo- und skotophiler Phase. Wir kennen von *anderen* Pflanzen, namentlich von *Canavalia* und *Phaseolus*, recht gut den Verlauf der Blattbewegungen; aber wir kennen doch von keiner Pflanze etwa auch nur die exakte Beziehung zwischen dem Verlauf der endogenen Tagesrhythmik und dem Verlauf der Blattbewegungen. Die Kombination jener beiden an verschiedenartigen Pflanzen studierten Phänomene zu einem allgemeinen Schema war ein notwendiges Übel, das jetzt dringend behoben werden muß. Auch die neuen Untersuchungen von HARDER (1949) und FLÜGEL lassen erkennen, wie mißlich es ist, daß wir nicht von ein und demselben Objekt hinreichend genau wissen, wie die endogene Rhythmik und ihre Folge- oder Begleiterscheinungen, also etwa Fermentaktivität, photoperiodische Sensibilität und Bewegungsrhythmik miteinander in Beziehung stehen.

Fragen wir zunächst nach der Tagesrhythmik der photoperiodischen Sensibilität. Die einzige Methode zur Feststellung des An- und Abschwellens der photophilen und skotophilen Phase besteht darin, zu prüfen, in welchem Sinne und in welcher Intensität das Licht in den einzelnen Zeitpunkten der endogenen Rhythmik photoperiodisch, also auf die Blütenbildung wirkt.

Die Regelung der endogenen Tagesrhythmik durch den Licht-Dunkelwechsel läßt sich durch folgende Kurve (Abb. 1) angenähert

darstellen. Diese Kurve ist etwas gegenüber dem früher von mir gegebenen Schema verändert, indem die Gipfel um einige Stunden nach links verschoben wurden. Herr Kollege HARDER machte mich freundlicherweise darauf aufmerksam, daß die früher von mir gezeichnete Kurve das Verhalten der meist untersuchten Kurztagpflanzen nicht richtig wiedergibt (vgl. auch FLÜGEL). Die photophile Phase pflegt schon früher als 12 Std nach Beginn der Lichtperiode beendet zu sein.

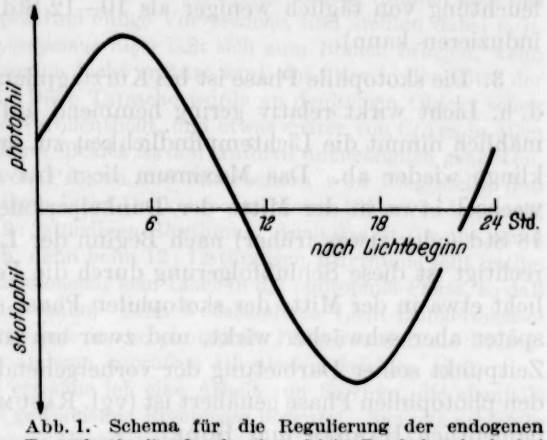

Abb. 1. Schema für die Regulierung der endogenen Tagesrhythmik durch den Licht-Dunkelwechsel bei Kurztagpflanzen. Werte oberhalb der eingezeichneten Abszisse bedeuten photoperiodisch photophilen, Werte unterhalb dieser Abszisses skotophilen Charakter. Dem Maximum und Minimum der eingezeichneten Kurve entspricht der stärkste photophile bzw. skotophile Charakter. Die Dauer der (in der Abbildung bei der Abszisse Null beginnenden) Lichtperiode ist für den Verlauf der Kurve ziemlich belanglos.

Für die Regelung der Rhythmik bei den Langtagpflanzen gilt etwa das in Abb. 2 wiedergegebene Schema. Die photophile Phase beginnt also wesentlich später als bei den Kurztagpflanzen.

Wieweit sind nun diese Kurven eine Wiedergabe experimentell ermittelter Tatsachen, und wieweit enthalten sie Extrapolationen?

Gesichert sind folgende Einzelheiten:

1. Bei den Kurztagpflanzen besteht sofort nach Beginn der Lichtperiode die photophile Phase, und sie wird 8 bis 12 Std nach Beginn dieser Lichtperiode von der skotophilen abgelöst.

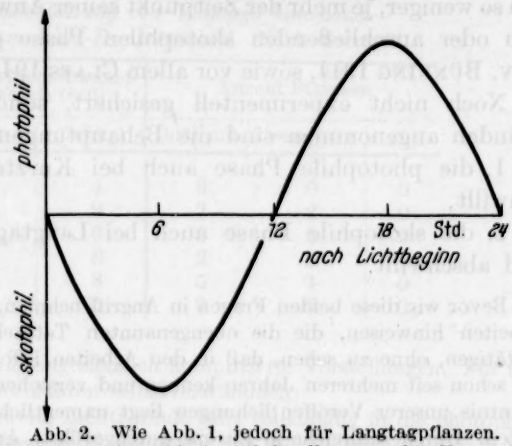

Abb. 2. Wie Abb. 1, jedoch für Langtagpflanzen. Die Kurven der Abb. 1 und 2 sollen nur den Unterschied in der zeitlichen Regulierung der Phasen zeigen. Selbstverständlich kann, wie im Text weiter ausgeführt wird, das Ausmaß des skotophilen Charakters bei Langtagpflanzen nur sehr gering sein im Vergleich zu dem bei Kurztagpflanzen erreichten. Die gleich tiefe Senkung der Kurven in Abb. 1 und 2 darf also nicht bedeuten, die Langtagpflanze könne ebenso stark skotophil werden wie die Kurztagpflanze.

2. Bei Langtagpflanzen beginnt die photophile Phase erst etwa 10—12 Std nach Lichtbeginn (oder wenn sie schon vorher bestehen

sollte, ist doch vor Ablauf dieser 10—12 Std der photophile Charakter so schwach, daß auch eine lange Zeit hindurch vorgenommene Beleuchtung von täglich weniger als 10—12 Std nicht die Blütenbildung induzieren kann).

3. Die skotophile Phase ist bei Kurztagpflanzen zunächst „schwach", d. h. Licht wirkt relativ gering hemmend auf die Blütenbildung. Allmählich nimmt die Lichtempfindlichkeit zu, erreicht ein Maximum und klingt wieder ab. Das Maximum liegt bei normalem Licht-Dunkelwechsel etwa in der Mitte der Dunkelperiode, d. h. es wird ungefähr 18 Std (oder etwas früher) nach Beginn der Lichtperiode erreicht. Berechtigt ist diese Schlußfolgerung durch die Feststellung, daß ein Störlicht etwa in der Mitte der skotophilen Phase am stärksten, vorher und später aber schwächer wirkt, und zwar um so schwächer, je mehr der Zeitpunkt seiner Darbietung der vorhergehenden oder der anschließenden photophilen Phase genähert ist (vgl. RASUMOV, BÜNNING 1944, sowie namentlich HARDER und BODE).

4. Ganz entsprechend ist die photophile Phase bei Langtagpflanzen zunächst schwach, strebt einem Maximum zu und klingt wieder ab. Diese Feststellung ist durch die Tatsache gesichert, daß ein den Kurztag ergänzendes Zusatzlicht die Blütenbildung am stärksten fördert, wenn es etwa in der Mitte der photophilen Phase geboten wird, aber um so weniger, je mehr der Zeitpunkt seiner Anwendung der vorhergehenden oder anschließenden skotophilen Phase genähert ist (vgl. RASUMOV, BÜNNING 1944, sowie vor allem CLAES 1945, und CLAES und LANG).

Noch nicht experimentell gesichert, sondern nur aus Analogiegründen angenommen sind die Behauptungen, daß

1. die photophile Phase auch bei Kurztagpflanzen an- und abschwillt,

2. die skotophile Phase auch bei Langtagpflanzen allmählich an- und abschwillt.

Bevor wir diese beiden Fragen in Angriff nehmen, möchte ich kurz auf einige Arbeiten hinweisen, die die obengenannten Tatsachen und Schlußfolgerungen bestätigen, ohne zu sehen, daß in den Arbeiten Effekte beschrieben werden, die wir schon seit mehreren Jahren kennen und verstehen. Der Grund für diese Unkenntnis unserer Veröffentlichungen liegt namentlich in sprachlichen Schwierigkeiten. Durch zahlreiche in Europa durchgeführte Arbeiten wissen wir seit Jahrhunderten, daß es eine endogene Tagesrhythmik gibt. Diese Arbeiten, selbst die neueren unter ihnen, sind in Amerika zufällig nicht bekannt geworden. So ist es auch nicht verwunderlich, daß die bei uns seit 15 Jahren diskutierten Beziehungen zwischen der endogenen Tagesrhythmik und dem Photoperiodismus ebenfalls nicht außerhalb des europäischen Kontinents bekannt wurden, ganz zu schweigen von den Veröffentlichungen der jüngsten 10 Jahre, die diese Beziehungen bestätigt haben.

Sehr deutlich zeigt sich diese zunehmende Isolierung der „Nationalwissenschaften" z. B. in einer neuen Veröffentlichung von PARKER, HENDRICKS und

Borthwick (1950). Die Autoren machten bei ihren verdienstvollen, für das weitere Verständnis des Photoperiodismus so wichtigen exakten Studien über das photoperiodische Wirkungsspektrum einige Vorversuche, und stellten dabei z. B. fest: Die Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* läßt sich zum Blühen bringen, wenn der Kurztag durch einige Stunden Licht ergänzt wird, das etwa in der Mitte der Dunkelperiode geboten wird. Diese Tatsache wurde an demselben Objekt schon 1944 von mir beobachtet und veröffentlicht, und etwas später von Claes in allen Einzelheiten sehr genau studiert. Beides ist den Autoren unzugänglich geblieben.

In der gleichen Arbeit von Parker und Mitarbeitern wird festgestellt, daß *Hyoscyamus* im 12 : 12stündigen Licht-Dunkelwechsel keine Blüten bildet, wohl aber z. B. im 6 : 6, 4 : 4 und 2 : 2stündigen Rhythmus. Auch das ist für uns schon seit Jahren selbstverständlich, denn beim 12 : 12stündigen Rhythmus fällt natürlich, dem Schema Abb. 2 entsprechend, kein Licht in die photophile Phase, so daß die Pflanze auch nicht blühen kann. Beim 6 : 6stündigen Licht-Dunkelwechsel fällt jeweils die zweite Lichtperiode in die photophile Phase, so daß die Blütenbildung ähnlich wie bei den anderen geprüften Rhythmen, erfolgen muß.

Als ein weiteres Beispiel erwähne ich eine Arbeit von Snyder, die ebenfalls eine Bestätigung der von uns gewonnenen Ergebnisse bedeutet. Snyder arbeitete mit der Langtagpflanze *Plantago lanceolata* und prüfte die Blütenbildung in verschiedenen Licht-Dunkelzyklen. Von seinen zahlreichen Versuchsreihen seien die herausgegriffen, bei denen sich die gewählten Zyklen der 24-Std-Rhythmik einfügen. Nach 19 Tage langer Einwirkung der betreffenden Zyklen wurde die Anzahl blühender, vegetativ gebliebener und toter Pflanzen ermittelt. Dabei ergaben sich die in Tabelle 1 genannten Resultate.

Tabelle 1. *Blütenbildung von Plantago lanceolata bei verschiedenem Licht-Dunkelwechsel.* Nach Snyder.

Versuchs-nummer	Art des Licht-Dunkel-wechsels (Std)		Anzahl Pflanzen		
	Licht	Dunkel	blühend	vegetativ	tot
3	8	4	9	0	0
5	8	8	7	2	0
9	8	16	0	6	3
19	4	8	2	3	4
24	16	8	5	4	0
32	18	6	9	0	0

Snyder entwirft zur Erklärung ziemlich komplizierte Vorstellungen. Für uns sind die Tatsachen schon seit Jahren selbstverständlich:

Versuch 3. Jeweils die zweite Lichtperiode fällt vollständig in die photophile Phase, also bestehen sehr günstige Bedingungen für die Blütenbildung.

Versuch 5. Jeweils die zweite Lichtperiode fällt in die photophile Phase, also bestehen wieder gute Voraussetzungen für die Blütenbildung.

Versuch 9. In die photophile Phase fällt kein Licht, also kann keine Blütenbildung erwartet werden.

Versuch 19. Jeweils die zweite Lichtperiode fällt in den Anfang der photophilen Phase, in deren Maximum herrscht aber wieder Dunkelheit. So ist nur eine schwache Förderung der Blütenbildung zu erwarten.

Versuch 24. Der letzte Teil der Lichtperiode fällt in die photophile Phase, aber während deren Maximum besteht schon wieder Dunkelheit, also sind die Bedingungen für die Blütenbildung nicht ganz so gut wie etwa bei Versuch 3 oder 5.

Versuch 32. Die Lichtperiode erreicht noch das Maximum der photophilen Phase, also bestehen sehr günstige Bedingungen für die Blütenbildung.

Die Beobachtungen bestätigen in allen Fällen die Schlußfolgerung. Dem Photoperiodismus von *Plantago lanceolata* muß eine Steuerung der endogenen Rhythmik durch den Licht-Dunkelwechsel zugrunde liegen, die sehr genau dem Schema Abb. 2 entspricht. Das heißt, es wird wieder bestätigt, daß die photophile Phase allmählich ansteigt und nach Erreichung eines Maximums abklingt.

Eine Methode zur Ermittlung des Verlaufs der photophilen Phase bei Kurztagpflanzen ist von HARDER und GÜMMER benutzt worden. Freilich war es nicht die Absicht dieser Autoren, eine solche Methode zu finden, sondern es sollte geprüft werden, wieweit sich die Tatsachen mit der Vorstellung einer Beziehung des Photoperiodismus zur endogenen Rhythmik vereinbaren lassen. HARDER und GÜMMER boten der Kurztagpflanze *Kalanchoë Bloßfeldiana* Langtagbedingungen. Schließlich wurden diese Langtage durch 4stündige Kurztage unterbrochen, und zwar war bei den einzelnen Versuchen die zeitliche Lage dieser Kurztage verschieden, d. h. einmal wurden die 4 Std Licht morgens, bei der nächsten Reihe später am Vormittag usw. geboten. Die Kurztage alternierten mit Langtagen der vorher gebotenen Art, wodurch gewährleistet wurde, daß der Verlauf der endogenen Rhythmik nicht, oder nicht erheblich umreguliert wurde. Mit solchen Versuchen muß sich meines Erachtens einwandfrei zeigen lassen, zu welchen Tageszeiten die Pflanze am meisten photophil ist, nämlich dann, wenn jene Kurztagbeleuchtung die stärkste fördernde Wirkung auf die Blütenbildung hat.

Analysiert man die experimentellen Daten von HARDER und GÜMMER, so ergibt sich der in Abb. 3 dargestellte Verlauf der photophilen Phase. (Der Verlauf der skotophilen Phase wurde nach den älteren Versuchen von HARDER und BODE ergänzt, also die Quantität der Hemmung durch ein nächtliches Störlicht als Maß des skotophilen Charakters benutzt.) Der genaue Zeitpunkt des Übergangs von der photophilen zur skotophilen und von der skotophilen zur photophilen Phase wurde offengelassen. Die Versuche lassen diesen Zeitpunkt nicht sicher erkennen. (Vielleicht liegt auch je nach den Versuchsbedingungen die photophile Phase manchmal schon vor Beginn der täglichen Lichtperiode, manchmal etwas später.)

Dieser Verlauf der endogenen Rhythmik bei *Kalanchoë* vermag die Resultate aller Beleuchtungsrhythmen, die sich an den 24-Std-Zyklus halten, zu erklären:

1. Bei Beleuchtung von 6—10 Uhr fällt das Licht in den Anfang der photophilen Phase. Das Maximum der photophilen Phase fällt schon wieder in die Dunkelperiode. Ein starker Blühimpuls kann also nicht erwartet werden. HARDER und GÜMMER stellten ein Fehlen der Blütenbildung fest.

2. Beleuchtung von 8—12 Uhr ist natürlich für die Blütenbildung günstiger, weil jetzt das Licht nur in die photophile Phase fällt und deren Maximum mehr genähert ist. So ist das Resultat, Blütenbildung nach 42 Tagen, begreiflich.

3. Beleuchtung von 10—14 Uhr muß noch günstiger sein, weil sie im Bereich des Maximums der photophilen Phase liegt. Das Ergebnis, Blütenbildung nach 33 Tagen, ist also verständlich.

4. Auch die Beleuchtung von 12—16 Uhr muß sehr günstig sein, weil wieder das Maximum der photophilen Phase getroffen wird. Das Ergebnis, Blütenbildung nach 35 Tagen, paßt also zur Theorie.

5. Beleuchtung von 14—18 Uhr muß wieder ungünstiger sein, weil nicht mehr das Maximum der photophilen Phase getroffen wird, und zudem der letzte Teil der Lichtperiode vielleicht schon in die skotophile Phase fällt. So ist die langsamere Blütenbildung (nach 62 Tagen) selbstverständlich.

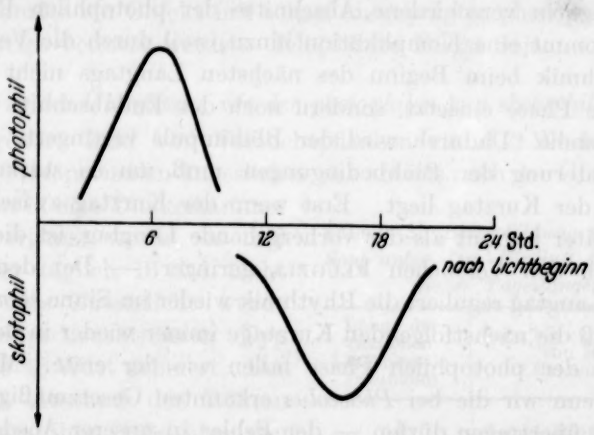

Abb. 3. Verlauf der photo- und skotophilen Phase bei *Kalanchoë Bloßfeldiana*. Die photophile Phase wurde nach den Versuchen von HARDER und GÜMMER, die skotophile nach denen von HARDER und BODE errechnet.

6. Noch ungünstiger muß natürlich eine Beleuchtung von 16—20 Uhr wirken, denn hier fällt nur noch der erste Teil der Lichtperiode in die photophile Phase. Derart erklärt sich das Fehlen der Blütenbildung.

Es darf nicht behauptet werden, daß sich auch die Ergebnisse, die HARDER und GÜMMER bei der Anwendung komplizierterer Beleuchtungsrhythmen erhielten, vollständig mit unserem Grundschema erklären lassen. Wir können noch nicht entscheiden, ob auch andersartige Lichtwirkungen im Spiel sind, weil wir nicht übersehen können, wie die endogene Rhythmik bei diesen Beleuchtungsrhythmen reguliert wird. Hier können also nur Versuche mit Objekten weiterhelfen, bei denen sowohl der Verlauf der endogenen Rhythmik als auch das photoperiodische Verhalten bekannt ist. Daß aber darüber hinaus auch schon die Auswertung des Teils der Versuche von HARDER und GÜMMER, die wir als die am leichtesten übersehbaren herausgegriffen haben, nicht zu ganz zuverlässigen Ergebnissen führen kann, zeigen uns die Untersuchungen FLÜGELS. FLÜGEL prüfte den Verlauf der tagesperiodischen Bewegungen bei *Phaseolus* unter dem Einfluß eines Licht-Dunkelwechsels, wie ihn HARDER und GÜMMER bei *Kalanchoë* angewendet hatten, also beim Wechsel

von Langtagen und Kurztagen, wobei die Kurztage zu unterschiedlichen Tageszeiten geboten wurden. Dabei ergab sich, daß die dem Kurztag folgende Nachtstellung bei verhältnismäßig früh gegebenen Kurztagen (0—4½ Std später als der vorgehende Langtag beginnend) vollständig vom Beginn des Kurztages, also nicht mehr vom Beginn des vorhergehenden Langtages determiniert wird. Wenn bei *Kalanchoë* ähnliche Regeln gelten, ist mit der Versuchsanordnung von HARDER und GÜMMER wohl gewährleistet, daß der Kurztag je nach seiner zeitlichen Lage in verschiedene Abschnitte der photophilen Phase fällt; aber es kommt eine Komplikation hinzu, weil durch die Verschiebung der Rhythmik beim Beginn des nächsten Langtags nicht schon die photophile Phase einsetzt, sondern noch der Endabschnitt der skotophilen besteht. Dadurch wird der Blühimpuls verringert. Und diese Verschlechterung der Blühbedingungen muß um so stärker werden, je später der Kurztag liegt. Erst wenn der Kurztag zwischen 6 und 10 Std später beginnt als der vorhergehende Langtag, ist die Verschiebung nach den Versuchen FLÜGELS geringer. — Der dem Kurztag folgende Langtag reguliert die Rhythmik wieder im Sinne *seines* Beginns um, so daß die nächstfolgenden Kurztage immer wieder in den gleichen Abschnitt der photophilen Phase fallen wie der erste. Mir scheint, daß — wenn wir die bei *Phaseolus* erkannten Gesetzmäßigkeiten auf *Kalanchoë* übertragen dürfen — der Fehler in unserer Ausdeutung der Versuche von HARDER und GÜMMER sich im wesentlichen darin äußern muß, daß das Maximum der photophilen Phase schwächer erscheint als es tatsächlich ist. Aber da eben jene Übertragung der an *Phaseolus* gewonnenen Erkenntnisse bedenklich erscheint, liegt in unserer Ausdeutung der Versuche mit *Kalanchoë* eine Unsicherheit.

Eine weitere Frage ist es, ob sich jener aus den Versuchen von HARDER und BODE bzw. HARDER und GÜMMER erkennbare Verlauf der endogenen Tagesrhythmik auch in Blattbewegungen äußert. HARDER (1950) teilt Versuche BÜNSOWS mit, nach denen die endogene Rhythmik bei *Kalanchoë* zu tagesperiodischen Hebungs- und Senkungsbewegungen der Blütenblätter führt. Die maximale Hebung wird bei normalem Licht-Dunkelwechsel gegen 24 Uhr, die maximale Senkung (d. h. Öffnung der Blüten) gegen 12 Uhr erreicht. HARDERS Schlußfolgerung, „bei *Kalanchoë*... ist das Blatt bei Lichtbeginn in absteigender Bewegung, befindet sich also in der skotophilen Phase, ... Nach wenigen Lichtstunden tritt dann bereits die Bewegungsumkehr und damit erst die photophile Phase ein, die dann bis in die Dunkelperiode anhält" kann ich nicht zustimmen. Die Phase der Blatthebung ist ja nicht als photophile Phase definiert. Es ist lediglich eine „anscheinend weit verbreitete Regel" (BÜNNING 1944), daß bei *Laubblättern* während der photophilen Phase eine Blatthebung erfolgt. Schon Kotyledonen verhalten sich, wie bereits 1944 betont wurde, anders. Wir können also nicht erwarten, daß sich die Blütenblätter ebenso verhalten müssen wie die Laubblätter. Es scheint, daß bei *Kalanchoë* die maximale Blütenöffnung im Zeitpunkt des Maximums der photophilen, die extreme Blütenschließung im Zeitpunkt des Maximums der skotophilen Phase erreicht wird.

2. Der Verlauf der endogenen Rhythmik bei Biloxi-Soja.

Eine feste Grundlage für weitere Untersuchungen kann nur geschaffen werden, wenn wir bei ein und demselben Objekt einigermaßen genau ermitteln:

1. den Verlauf von photophiler und skotophiler Phase,
2. den Verlauf der Blattbewegungen,
3. den Verlauf der Fermentaktivität und anderer tagesperiodischer Schwankungen von physiologischen Vorgängen.

Hierzu mußte ein Objekt mit scharf ausgeprägter photoperiodischer Reaktionsweise benutzt werden. Ich wählte Biloxi-Soja.

a) Ermittlung des Überganges von der photophilen zur skotophilen Phase.

Eine größere Zahl von Versuchspflanzen stand 3 Wochen unter dem Einfluß des normalen Tageslichts, das abends nach der Übertragung der Pflanzen in eine Dunkelkammer um 2 Std ergänzt wurde so daß die Pflanzen täglich 16 Std Licht erhielten. Das Zusatzlicht wurde von 9 Philips-Leuchtröhren Typ P/55A zu je 40 Watt geliefert. Der gegenseitige Abstand der Röhren betrug 10 cm, ihre Höhe über den Pflanzen etwa 50 cm. Die Temperaturen betrugen nachts 20—22°, am Tage bis 25°. Anschließend wurde bei einer Kontrollserie weiterhin der 16-Std-Tag geboten. Andere Reihen erhielten jetzt täglich nur eine Kurztagbeleuchtung, deren Dauer bei jeder Reihe verschieden war. Jede Serie umfaßte etwa 10 Pflanzen. Tabelle 2 bringt die Ergebnisse.

Tabelle 2. *Blütenbildung von Biloxi-Soja unter dem Einfluß unterschiedlicher Tageslängen.*

Länge der täglichen Lichtperiode (Stunden)	Tage bis zum Auftreten von Blüten (Extremwerte)
16	keine Blütenbildung
12	30—35
10	18—20
8	22—26

Die optimale Tageslänge betrug also unter den gewählten Versuchsbedingungen etwa 10 Std. Das stimmt mit älteren Angaben überein.

b) Der Verlauf der skotophilen Phase.

Die skotophile Phase beginnt, wie wir sahen, unter den gewählten Versuchsbedingungen 10 Std nach Beleuchtungsbeginn. Die zweckmäßigste Methode zur Ermittlung ihres weiteren Verlaufs ist uns, wie weiter oben dargestellt wurde, schon bekannt. Nach gleichartiger Vorbehandlung mit Langtagen, wie sie oben beschrieben wurde, erhielten die Pflanzen täglich Kurztage (normales Tageslicht) von der optimalen 10-Std-Dauer. Der Kurztag wurde bei einer Serie fortlaufend geboten, bei anderen wurde die Dunkelperiode täglich durch eine 1stündige Lichtperiode unterbrochen. Die zeitliche Lage dieses Störlichts war von Reihe zu Reihe verschieden. Als Störlicht diente das oben beschriebene

künstliche Licht. Dieses Störlicht wurde in jeder Reihe 12 Tage lang geboten. Tabelle 3 bringt die Ergebnisse. Jede Reihe umfaßte etwa 10 Pflanzen.

Die skotophile Phase erreicht ihr Maximum also gegen 23 Uhr, d. h. 16 Std nach Lichtbeginn. Dieses Ergebnis ist natürlich mit einem Fehler behaftet, weil durch das Störlicht die endogene Rhythmik etwas verschoben wird, also nicht mehr *nur* die Hauptlichtperiode reguliert. Aus dem gleichen Grund ist es unzulässig, aus der Hemmung der Blütenbildung bei einer Störung von 6—7 Uhr zu schließen, hier bestehe noch die skotophile Phase. „Störlicht" von 6—7 Uhr bedeutet natürlich, zumal wenn es mehrere Wochen hindurch geboten wird, eine Verlängerung der Hauptlichtperiode um 1 Std. Eine genauere Ermittlung des Beginns der photophilen Phase am Morgen war also nicht möglich.

Tabelle 3. *Wirkung von nächtlichem Störlicht unterschiedlicher zeitlicher Lage bei Biloxi-Soja.* Die Hauptlichtperiode dauerte von 7—17 Uhr.

Störlicht	Tage bis zum Blühen (Extremwerte)
von 17—18 Uhr	25—28
„ 20—21 „	35—40
„ 22—23 „	keine Blütenbildung nach 40 Tagen
„ 0—1 „	2 Pflanzen blühend
„ 3—4 „	33—36
„ 5—6 „	19—22
„ 6—7 „	24—25
kein Störlicht	18—20

c) Der Verlauf der photophilen Phase.

Auch für die Ermittlung des Verlaufs der photophilen Phase ergibt sich die zweckmäßige Methode aus dem weiter oben Gesagten. Die Pflanzen standen zunächst wieder 3 Wochen in 16stündigem Langtag. Dann wurde nach der Methode von HARDER und GÜMMER nur noch an jedem 2. Tag Langtagsbeleuchtung geboten (zwecks Sicherung einer möglichst weitgehenden Fortführung der endogenen Rhythmik im Sinne der ursprünglichen Regulierung). An den übrigen Tagen erhielten die Pflanzen 5stündigen Kurztag, der aus künstlichem Licht der weiter oben genannten Art bestand. Um nun jene erörterte Schwierigkeit zu vermeiden, die sich aus der Verschiebung der Rhythmik ergibt, wenn die Kurztage später beginnen als die mit ihnen alternierenden Langtage, wurde der 5-Std-Kurztag in 2 Teile zerlegt. Der erste Teil dauerte 1 Std, der zweite 4 Std. Die erste Stunde wurde immer von 6—7 Uhr geboten, die 4-Std-Periode lag bei den einzelnen Reihen zu verschiedenen Tageszeiten. Diese Behandlung wurde 25 Tage durchgeführt und nachher wieder Langtage geboten. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse zusammen.

Bei der ersten Reihe muß, da überhaupt keine Blütenbildung erfolgt ist, der Kurztag zur Hauptsache oder ganz vor dem Maximum der photophilen Phase gelegen haben, bei der Reihe 4 im wesentlichen nach diesem Optimum. Bei der Reihe 2 müssen Beginn und Ende der Licht-

periode dem Maximum der photophilen Phase näher gewesen sein als bei Reihe 3. Dieses Maximum der photophilen Phase muß also etwa gegen 10—11 Uhr, d. h. 4—5 Std nach Beleuchtungsbeginn erreicht gewesen sein. Dazu sei wieder betont, daß das Ergebnis mit einem Fehler behaftet ist, weil auch die Kurztage die endogene Rhythmik mit regulieren.

Unter unseren Versuchsbedingungen verliefen also die photophile und skotophile Phase von Biloxi-Soja etwa so, wie es in Abb. 4 dargestellt ist.

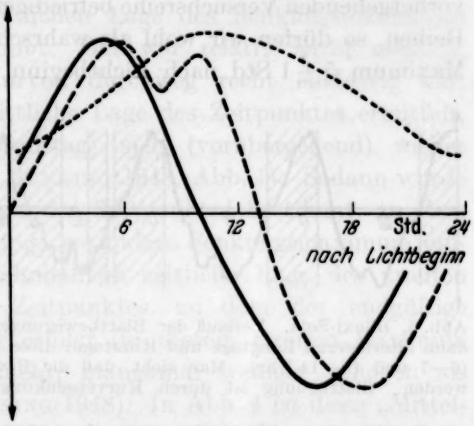

Abb. 4. Biloxi-Soja. Ausgezogene Kurve: Verlauf der photo- und skotophilen Phase (Bedeutung wie in Abb. 1). Gestrichelte Kurve: Verlauf der Blattbewegungen. Kurvenhebung bedeutet Blatthebung, Kurvensenkung Blattsenkung. Der höchste Kurvenpunkt zeigt also den Zeitpunkt extremster Hebungslage des Blattes. Punktierte Kurve: Verlauf der Amylaseaktivität.

Bei einer zweiten Serie wurde die Zwischenschaltung von Kurztagen nur einige Tage hindurch vorgenommen, um noch bessere Gewähr zu haben, daß keine zu starke Verschiebung im Verlauf der Rhythmik gegenüber der vorher erfolgten Regulierung eintrat. Es wurden den erst 6 Wochen alten Pflanzen nur 7 Kurztage, und zwar von je 4 Std, geboten, die also wegen des Alternierens mit Langtagen über 2 Wochen verteilt waren. Die Kurztage waren wieder in zwei Perioden (1 und 3 Std) zerlegt. Die erste Periode begann um 6 Uhr, die zweite je nach der Versuchsreihe zu verschiedenen Tageszeiten. Dann verblieben die Pflanzen noch 3 Wochen im Langtag, der, wie auch vor der Kurztagebehandlung, morgens um 6 Uhr begann und 16 Std dauerte. Zum Blühen kamen diese Pflanzen nicht, aber die vegetative Entwicklung konnte als Maß der photoperiodischen Reaktion benutzt werden. Die Höhe der Pflanzen ist in Tabelle 5 angegeben (Mittelwerte aus je 20 bis 25 Pflanzen).

Tabelle 4. *Blütenbildung bei Biloxi-Soja unter dem Einfluß von Kurztagen, die mit Langtagen alternieren.* Langtag jeweils von 6—22 Uhr, 1. Periode des Kurztages von 6—7 Uhr, 2. Periode unterschiedlich.

Reihe	Zeitliche Lage der 2. Periode des Kurztags	Tage bis zum Blühen nach Beginn des Einschiebens von Kurztagen (Extremwerte, je 10 Pflanzen)
1	7—11 Uhr	keine Blütenbildung
2	8—12 „	30—34
3	10—14 „	33—37
4	12—16 „	nach 40 Tagen erst eine Pflanze blühend

Hiernach würde das Maximum der photophilen Phase zwischen 10^{30} und 14^{30} Uhr erreicht gewesen sein, d. h. $4^1/_2$—$6^1/_2$ Std nach Beginn der ersten Lichtperiode. Das stimmt mit dem Ergebnis der vorhergehenden Versuchsreihe befriedigend überein. Vereinigen wir beide Reihen, so dürfen wir wohl als wahrscheinlichsten Zeitpunkt für jenes Maximum 5 ± 1 Std nach Lichtbeginn angeben.

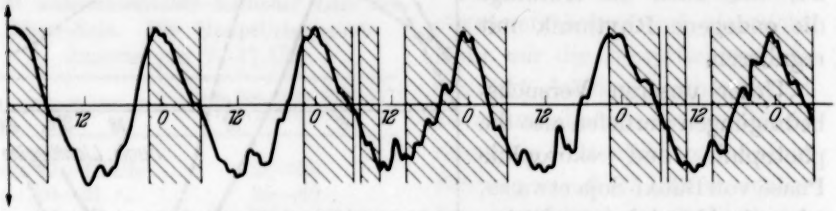

Abb. 5. Biloxi-Soja. Verlauf der Blattbewegungen. Die Pflanze erhielt erst Langtage, dann alternierend Langtage und Kurztage; diese Kurztage bestanden aus zwei Perioden (6—7 und 10—14 Uhr). Man sieht, daß die Bewegungen nicht wesentlich verschoben werden. Blatthebung ist durch Kurvensenkung angezeigt. Dunkelzeiten schraffiert.

Bei unseren Versuchen wurde, wie gesagt, ein Teil des Kurztages immer um 6 Uhr beginnend gegeben, um mit einer größeren Sicherheit die Umregulierung der endogenen Rhythmik zu verhindern. Die Zwischenschaltung von Langtagen allein genügt, wie die Versuche von FLÜGEL zeigen, nicht. Um nun zu prüfen, ob der Zweck bei unserer Versuchsanordnung erreicht worden ist, verfolgte ich auch den Verlauf der Blattbewegungen bei einem ähnlichen Beleuchtungsrhythmus (Abb. 5). Man sieht, daß die Rhythmik während der Kurztagbehandlung den alten Verlauf befriedigend genau beibehält. Unsere Resultate können also nicht wesentlich dadurch gestört sein, daß die zweite Periode des Kurztags die photophile Phase in die nächste Langtagsperiode hineinschiebt.

Tabelle 5. *Vegetative Entwicklung von Biloxi-Soja unter dem Einfluß von Kurztagen, die mit Langtagen alternieren.* Eine Periode des Kurztages immer von 6—7 Uhr, die zweite Periode unterschiedlich. Langtage von 6—22 Uhr.

Zeitliche Lage der 2. Periode des Kurztages	Höhe der Pflanzen in cm
7^{30}—10^{30} Uhr	$23{,}8 \pm 1{,}2$
9^{30}—12^{30} „	$22{,}0 \pm 1{,}0$
11^{30}—14^{30} „	$17{,}9 \pm 1{,}1$
13^{30}—16^{30} „	$20{,}9 \pm 1{,}2$
15—18	$24{,}2 \pm 1{,}3$
Langtag	$26{,}1 \pm 1{,}5$

d) Vergleich mit dem Verlauf der Blattbewegungen.

Um nun sehen zu können, wie die tagesperiodischen Blattbewegungen mit dem Verlauf von photophiler und skotophiler Phase zusammenhängen, wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen zahlreiche Blattbewegungen registriert, und zwar unter dem Einfluß des 16-Std-Tages. Bekanntlich bestehen in den Bewegungskurven einzelner Pflanzen, sowie ein und derselben Pflanze an verschiedenen Tagen, Unterschiede in der zeitlichen Lage der Gipfelpunkte und in anderen Einzelheiten

(vgl. auch FLÜGEL, sowie die Kurven für Biloxi-Soja bei BÜNNING 1948). Um diese Unterschiede einigermaßen auszugleichen, wurde aus dem von 10 verschiedenen Pflanzen an 5—6 aufeinanderfolgenden Tagen geschriebenen Kurven eine mittlere Kurve konstruiert. Dazu wurden einmal die Mittelwerte der zeitlichen Lage des Senkungsmaximums (extreme Nachtstellung) bestimmt. Das war relativ leicht möglich, weil dieser Punkt in den Kurven durchweg recht eindeutig war. Zweitens wurde die durchschnittliche Lage des Zeitpunktes ermittelt, in dem die Blätter (am Vormittag) sich (vorübergehend) wieder etwas zu senken beginnen (vgl. BÜNNING 1948, Abb. 1). Sodann wurde noch die durchschnittliche Lage des Zeitpunktes bestimmt, zu dem das bald hernach erreichte geringe sekundäre Senkungsmaximum eintritt, und endlich die durchschnittliche zeitliche Lage des zweiten Hebungsmaximums, also des Zeitpunktes, zu dem der endgültige Übergang in die Nachtstellung erfolgt (in diesem zweiten Maximum sind die Blätter manchmal mehr, manchmal weniger gehoben als im ersten (vgl. Abb. 1 bei BÜNNING 1948). In Abb. 4 ist diese „Mittelkurve" eingetragen, so daß ein Vergleich mit den Kurven des Wechsels von photophiler und skotophiler Phase möglich wird.

Wir können danach feststellen:

1. Der endgültige Übergang in die Nachtstellung, also das Überschreiten des letzten Hebungsmaximums deckt sich, wie schon früher festgestellt wurde (BÜNNING 1948), zeitlich mit dem Beginn der skotophilen Phase.

2. Dagegen deckt sich der Anfang der photophilen Phase nicht mit dem Beginn der Blatthebung. Genau konnten wir, wie oben ausgeführt wurde, den Beginn der photophilen Phase mit unseren Methoden nicht ermitteln, aber wenn eine Extrapolation erlaubt ist, dürfte er etwa 2 Std vor Lichtbeginn liegen. Die Blatthebung beginnt aber schon 4 Std früher, und zwar ziemlich bald nach dem Erreichen des Maximums der skotophilen Phase. Es scheint also, als würde nicht erst der Übergang in die photophile Phase, sondern schon der Beginn des Abklingens der skotophilen Phase die Umkehr der Bewegungsrichtung des Blattes induzieren. Die Umschaltung der Bewegungsrichtung würde dann bei Soja nur etwas hinter dem Beginn des Abschwellens der photophilen Phase zurückbleiben.

3. Das *erste* Maximum der Blatthebung zeigt ziemlich genau das Maximum der photophilen Phase an, jedoch ist auch hier eine Verzögerung um einige Stunden feststellbar.

Wir sehen hieraus, daß die ursprünglich gewählte Formel: Blatthebung entspricht der photophilen, Blattsenkung der skotophilen Phase, die Tatsachen nur ungenau wiedergibt. Wenn sich die Blätter bei manchen Pflanzen noch etwa bis zum Ende der photophilen Phase

heben (also ihr erstes Hebungsmaximum nicht schon wie Soja ungefähr im Zeitpunkt des Maximums der photophilen Phase erreichen), so muß das anscheinend als ein „Nachhinken" angesehen werden, das wohl bei Blättern mit Wachstumsbewegungen besonders stark sein kann. Ebenso ist es offenbar ein Nachhinken, wenn bei manchen Pflanzen die Blätter ihr Senkungsmaximum erst ungefähr am Ende der skotophilen Phase zu erreichen schienen. Wenn das „Nachhinken" nur schwach ist (wie anscheinend bei Soja), so wird das erste Hebungsmaximum sehr bald nach dem Maximum der photophilen, das Senkungsmaximum sehr bald nach dem Maximum der skotophilen Phase erreicht.

Dafür, daß nicht einfach das Senken, sondern das Erreichen einer bestimmten Senkungslage der Blätter der skotophilen Phase entspricht, und dementsprechend nicht der Hebungsbeginn, sondern erst das Erreichen einer bestimmten Hebungslage den Beginn der photophilen Phase anzeigt, hatten übrigens schon die 1948 beschriebenen Versuche mit verschiedenen Sojasorten gesprochen: Bei den tagneutraleren Formen ist nicht nur der *Beginn* der Blattsenkung verzögert, sondern die Senkung selber ist auch viel schwächer[1].

e) Der Verlauf der Fermentaktivität.

Über die endogenen tagesperiodischen Schwankungen der Amylaseaktivität an *Phaseolus*-Gelenken hatte ich 1942 berichtet (und auch auf entsprechende Beobachtungen anderer Autoren hingewiesen). Ein Minimum der Aktivität war früh morgens, ein Maximum abends feststellbar. Die Versuche von Harder (1949 mit Ehrenberg) bestätigen dieses Ergebnis für das gleiche Objekt, zeigen aber genauer den ganzen Verlauf der Aktivitätskurve (vgl. auch Ehrenberg 1950).

Um die Beziehung der Fermentaktivität zum Verlauf der photophilen und skotophilen Phase erkennen zu können, wiederholte ich meine Versuche über den Tagesrhythmus der Amylaseaktivität jetzt mit der Biloxi-Soja. Ich wählte Pflanzen, die ebenso wie bei den vorher erwähnten Versuchen im 16-Std-Tag aufwuchsen. Die Amylaseaktivität prüfte ich in genau der gleichen Weise wie 1942. Analysiert wurden die ganzen Primärblätter von etwa 3 Wochen alten Pflanzen. Die in der Tabelle 6 genannten relativen Amylasemengen haben auch die gleiche Bedeutung wie in jener früheren Arbeit.

Die hiernach zu konstruierende Kurve der Amylaseaktivität ist auch noch in Abb. 4 eingetragen.

[1] Um zu zeigen, wie schwer es entscheidbar sein kann, ob die beginnende Blatthebung oder das Erreichen einer bestimmten Hebungslage dem Beginn der photophilen Phase entspricht, sei daran erinnert, daß bei manchen Pflanzen schon etwa 1—2 Std nach Beginn der Hebung etwa die Hälfte des gesamten Hebungswegs zurückgelegt sein kann.

Tabelle 6. *Relative Amylasemengen in den Primärblättern von Biloxi-Soja.* Die Pflanzen standen während der Entnahme der Proben von 6—22 Uhr im Licht.

Tageszeit der Extraktion	5	7	9	12	15	18	21	24
Relative Amylasenmenge	0,50	0,50	0,75	1,10	1,40	1,40	1,25	1,00

Danach ist, wie mir scheint, recht klar, daß der photophilen Phase zunehmende, der skotophilen Phase abnehmende Fermentaktivität entspricht. Die Übereinstimmung ist recht gut; ob sie ganz genau ist, können wir noch nicht entscheiden.

3. Der Verlauf der endogenen Tagesrhythmik bei Langtagpflanzen.

Es war noch nicht möglich, alle Versuchsreihen, die uns die Zusammenhänge zwischen dem Wechsel von photophiler und skotophiler Phase, den Blattbewegungen und der Fermentaktivität für eine Kurztagpflanze genauer haben erkennen lassen, an einer Langtagpflanze zu wiederholen. Aber einige Punkte seien doch schon erörtert.

Laibach (1949) bezweifelt, daß der Langtag oder das einige Stunden nach Beendigung eines Kurztages folgendes Zusatzlicht für die Blütenbildung der Langtagpflanze notwendig sei, um einer photophilen Phase Licht zu bieten. Er meint, die Bedeutung der zweiten Beleuchtung „besteht also offenbar nicht so sehr in einer die Blütenbildung fördernden Wirkung als vielmehr auf einer Ausschaltung . . . der hemmenden Wirkung der Dunkelzeit.“. Nun kann ich einerseits nicht sehen, ob es ratsam ist, einen Unterschied zwischen einer Förderung und der Beseitigung einer Hemmung zu machen. Es soll ja zunächst nicht gedeutet werden, *warum* das Licht fördert, sondern vielmehr nur festgestellt werden, *ob* es fördert. Die Beseitigung einer Hemmung ist auch eine Förderung. Daß die Zusatzbeleuchtung nicht direkt die Blütenbildung fördert, schließt Laibach aus den Versuchen von Claes. Claes brachte *Hyoscyamus* sowohl im 7-Std-Tag mit 1 Std Zusatzlicht in der Mitte der anschließenden Dunkelperiode zum Blühen, als auch im 7-Std-Tag mit 2 Std entsprechendem Zusatzlicht. Laibach rechnet nun aus, daß „die Blühstoffausbeute je Lichttag bei 7 + 1 Std Licht höher als bei 7 + 2 Std Licht (20,8 : 15,6%)“ ist. Das wäre natürlich ein wichtiges Argument; aber Herr Kollege Laibach bestätigte mir, daß hier ein Rechenfehler vorliegt, denn die Blühstoffausbeute beträgt tatsächlich 21,4 bzw. 22,9%, d. h. sie ist bei der Darbietung von 2 Std Zusatzlicht größer als bei 1 Std Zusatzlicht. So war es natürlich zu erwarten, wenn man annimmt, daß das Zusatzlicht günstig wirkt, weil bis hier es in eine „photophile Phase“ fällt. Nach der Ausschaltung des

Rechenfehlers spricht also Laibachs Argumentation nicht gegen, sondern für meine Ansicht[1].

Eine andere Frage ist es, ob die dieser photophilen Phase bei den Langtagpflanzen vorhergehende Periode, also die unmittelbar nach Lichtbeginn einsetzende und etwa 10—12 Std andauernde Phase wirklich skotophil ist, oder nicht vielleicht nur eine Periode der Indifferenz gegen Licht, bzw. sogar eine Periode überaus niedriger Werte des photophilen Charakters ist. Aus Analogiegründen wurde bisher die Ansicht des Vorhandenseins einer skotophilen Phase vertreten. Natürlich war es selbstverständlich, daß der photophile Charakter im Vergleich zu dem der Rhythmik bei Kurztagpflanzen nur sehr schwach ausgeprägt sein kann, denn sonst müßte der erste Teil des Lichts immer ebenso wie bei Kurztagpflanzen das nicht in die photophile Phase fallende Licht die Blütenbildung verhindern. Eine Tatsache, auf die Laibach hinweist, scheint der Annahme einer skotophilen Phase bei Langtagpflanzen zu widersprechen und zu zeigen, daß schon die bald nach Lichtbeginn einsetzende Phase auch bei Langtagpflanzen photophil ist: 7stündige Vorbeleuchtung mit anschließendem 1stündigem Zusatzlicht in der Mitte der Dunkelperiode fördert die Blütenbildung mehr als 5stündige Vorbeleuchtung mit 1 Std Zusatzlicht. Anscheinend wirkt also eine Verlängerung der Lichtgabe während der vermuteten skotophilen Phase nicht hemmend, sondern fördernd auf die Blütenbildung. Aber wenn in den ersten 10—12 Std nach Lichtbeginn wirklich schon eine photophile Phase vom gleichen Charakter wie die später einsetzende bestünde, wäre nur mit weiteren Hilfsannahmen zu erklären, warum nicht eine lang genug fortgesetzte Behandlung mit 10-Std-Tagen schließlich doch zum Blühen führt. Die recht plötzliche und starke Zunahme des Blühimpulses bei einer Verlängerung der täglichen Beleuchtungszeit über die kritische Tageslänge hinaus spricht doch dafür, daß der eigentliche photophile Charakter erst nach Erreichung der kritischen Tageslänge einsetzt. Man sollte also versuchen, für die Tatsache, daß in Claes' Versuchen 5 + 1 Std Licht die Blütenbildung weniger fördert als 7 + 1 Std, eine andere Erklärung zu finden.

Beleuchten wir nach der Methode von Claes z. B. von 7—12 und von 22—23 Uhr, so wird die endogene Rhythmik im Sinne des 7-Uhr-Lichtbeginns fortlaufen. Wenn die aufgeteilte Lichtperiode aber längere Zeit hindurch geboten wird, müssen wir damit rechnen, daß allmählich auch die zweite Lichtperiode einen determinierenden Einfluß auf den Gang der Rhythmik gewinnt. Wie das zu verstehen ist, können wir am besten am Verlauf der Bewegungen selber demonstrieren. Um zu zeigen, wie eine solche Mitdeterminierung gedacht werden kann,

[1] Herrn Kollegen Laibach danke ich für die Diskussion dieser und anschließender Fragen.

unternahm ich Versuche mit *Hyoscyamus niger*. Den Pflanzen wurde zunächst nur von 6—17 Uhr Licht geboten, später alltäglich von 6—9, sowie von 18—21 Uhr. Die Blattbewegungen verlaufen dabei in den ersten Tagen ähnlich wie vorher. Sehr bald aber beobachtet man die Überlagerung mit einem um 12 Std verschobenen Rhythmus, der also von der zweiten Lichtperiode induziert worden ist (Abb. 6). Solche Überlagerungen sind uns schon lange bekannt, und sie wurden als fehlender Synchronismus der Schwingungen in den einzelnen Teilen ein und desselben Blattes gedeutet (vgl. z. B. BÜNNING 1931). Wenn derart eine partielle Umstimmung der Rhythmik stattfindet, bedeutet

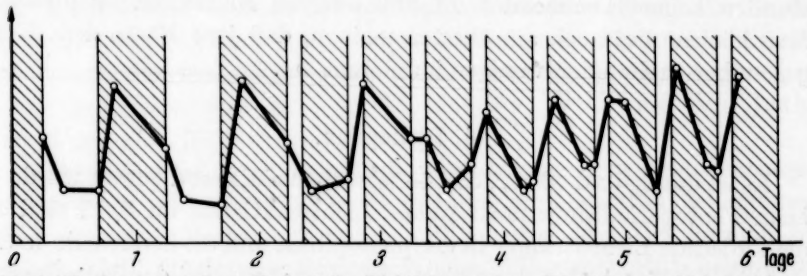

Abb. 6. *Hyoscyamus niger*. Verlauf der Blattbewegungen. Die Pflanze erhielt erst Langtage, dann täglich von 6—9 und von 18—21 Uhr Licht. Man sieht, daß bald an jedem Tag zwei Hebungs- und Senkungsbewegungen durchgeführt werden. Anstieg der Kurven bedeutet Blatthebung. Dunkelzeiten schraffiert.

die zweite Lichtperiode nicht mehr nur eine Darbietung von Licht in der photophilen Phase, sondern sie bedingt auch, daß in einem Teil der Gewebe die photophile Phase um einen halben Tag verschoben wird. In diesen Teilen würde dann die photophile Phase bestehen, während die erste der beiden täglichen Lichtperioden einwirkt. Damit wird dann natürlich auch die erste Lichtperiode als fördernder Faktor der Blütenbildung wichtig.

Ob noch andere Erscheinungen im Spiel sind, kann vorerst nicht festgestellt werden.

Auch nach diesen Versuchen bleibt es selbstverständlich unentschieden, ob bei Langtagpflanzen die ersten 10 Std nach Beginn einer Lichtperiode skotophil, indifferent oder etwa sehr schwach photophil sind. Ich versuchte noch, der Lösung dieser Frage durch einige Versuche mit *Plantago lanceolata* näherzukommen. Die Pflanzen wurden zunächst in 11stündigem Kurztag gehalten. Im Alter von 3 Monaten erhielt eine Gruppe (20 Pflanzen) 20 Langtage zu je 16 Std (6—22 Uhr). Die zweite Gruppe (ebenfalls 20 Pflanzen) erhielt alternierend ebensolche Langtage und andere Langtage, die von 11—13 Uhr durch eine Dunkelperiode unterbrochen waren. Ich hoffte, daß so die ursprüngliche Regulierung der endogenen Rhythmik beibehalten blieb und

demgemäß die 2stündige Dunkelperiode auf jeden Fall in den Abschnitt der endogenen Rhythmik fallen mußte, der der ausgesprochen photophilen Phase vorhergeht. Wenn dieser erste Abschnitt der endogenen Rhythmik wirklich skotophil ist, mußte durch die Unterbrechung der Lichtperiode eine Förderung der Blütenbildung bedingt werden. Bei der ersten Gruppe (nur gewöhnliche Langtage) wurden die Blütenanlagen 18—23, bei der zweiten Gruppe 17—21 Tage nach Beginn der Langtagbehandlung makroskopisch sichtbar. Aus den Versuchen konnte also nicht die erstrebte Schlußfolgerung gezogen werden. Jedenfalls zeigen die Versuche aber, daß die Fortnahme der beiden Lichtstunden keinen hemmenden Einfluß auf die Blütenbildung ausübte. Man könnte also noch am ehesten meinen, daß jene Phase dem Licht gegenüber mehr oder weniger indifferent ist.

4. Diskussion.

Es ist durchaus denkbar, daß — wie schon einleitend betont wurde — beim Photoperiodismus noch andere Lichtreaktionen im Spiel sind als die fördernde Lichtwirkung in der photophilen und die hemmende in der skotophilen Phase. Ich finde aber, daß, soweit uns bei den betreffenden Objekten überhaupt einigermaßen der Verlauf von photophiler und skotophiler Phase und das photoperiodische Verhalten bekannt sind, die Theorie allen Tatsachen gerecht wird. Natürlich müßte sofort eine Revision und Ergänzung vorgenommen werden, wenn Tatsachen gefunden werden, die sich mit dieser Auffassung nicht vereinbaren lassen.

Claes und Lang meinen, „daß es Befunde gibt, welche mit der endogenen Rhythmik allein nicht erklärt werden können. Das ist in erster Linie die Wirkung einer Entblätterung der Pflanzen, die zu einem vollständigen Fortfall der Tageslängenabhängigkeit der Blütenbildung führt". Dieser Argumentation kann ich mich nicht anschließen. Wenn die Tageslängenabhängigkeit beim Fortnehmen der Blätter verschwindet, so besagt das nichts gegen die Annahme, daß diese Tageslängenabhängigkeit (die eben nur bei der Anwesenheit der Blätter besteht), auf der endogenen Tagesrhythmik in diesen Blättern beruht. Daß „in den Blättern Vorgänge stattfinden, die nur in der Dunkelheit wirksam werden und die der Blütenbildung gegenüber den Charakter von Hemmungsvorgängen haben" ist nicht ein Argument gegen meine Auffassung, sondern kann ebensogut eine Interpretation dessen sein, was während einer Phase der endogenen Rhythmik abläuft.

Es ist noch verfrüht, eine Theorie darüber aufzustellen, wie die Zusammenhänge zwischen den einzelnen beobachteten Erscheinungen nun eigentlich sind. Besonders wichtig dürfte die weitere Untersuchung des Tagesrhythmus im Wuchsstoffabfluß aus den Blättern werden

(vgl. LAIBACH und KRIBBEN, BEZLER und BÜNNING). Daß die Fermentaktivität mit derjenigen der Wuchsstoffe zusammenhängt, ist durchaus wahrscheinlich, seitdem die Aktivierung von Wuchsstoffen durch Fermente bekannt ist. Will man auf Grund des bisher vorliegenden Materials wenigstens eine Vermutung darüber aufstellen, worin z. B. die hemmende Wirkung der Blätter besteht, so könnte man darauf hinweisen, daß das Auxin ein Antagonist des „Blühhormons" ist. Die Blätter als die Lieferanten des Wuchsstoffes müssen also notwendigerweise die Blütenbildung hemmen, und zwar vor allem während der photophilen Phase, in der die reichlichste Wuchsstoffabgabe stattfindet. Das Licht würde dann in der photophilen Phase vielleicht darum die Blütenbildung fördern, weil es durch die bekannte Photoinaktivierung des Auxins die Auxinabgabe vermindert. Aus den Versuchen von LAIBACH und Mitarbeiter ist bekannt, daß die Belichtung den Auxinabfluß aus den Blättern reduziert.

Eine solche Vorstellung würde mit den neueren Beobachtungen harmonieren, nach denen für die Herstellung optimaler Blühbedingungen ein bestimmtes Verhältnis zwischen Wuchsstoff und Blühhormon bestehen muß. Mindestens stärkere Wuchsstoffkonzentration hemmt die Blütenbildung (vgl. z. B. LAIBACH und KRIBBEN, HARDER und VAN SENDEN, LEOPOLD und THIMANN, RESENDE, sowie BONNER und THURLOW).

Wenn somit eine Deutung der fördernden Wirkung des Lichtes in der photophilen Phase in den Bereich der Möglichkeit gerückt ist, können wir uns über die Natur der hemmenden Wirkung des Lichtes in der skotophilen Phase noch keine experimentell begründete Vorstellung machen.

Es muß durchaus zugegeben werden, daß wir viele Erscheinungen des Photoperiodismus auch mit Hypothesen erklären können, die nicht auf die endogene Tagesrhythmik Rücksicht nimmt. Ob diese anderen Hypothesen einfacher sein können als unsere Annahmen, möchte ich bezweifeln. Mindestens leisten andere Hypothesen eines bestimmt nicht: Sie können wohl die photoperiodischen Erscheinungen deuten, nicht aber die Existenz der endogenen Tagesrhythmik. Schließlich darf nicht vergessen werden, daß die Suche nach einer entwicklungsphysiologischen Bedeutung der endogenen Tagesrhythmik sehr viel älter ist, als die Suche nach einer Erklärung für die photoperiodischen Erscheinungen. Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß bereits WEISMANN zur Erklärung des Selektionswerts der endogenen Tagesrhythmik nach so etwas wie dem Photoperiodismus suchte. Wenn wir daher jetzt experimentell begründete Annahmen über den Zusammenhang zwischen endogener Tagesrhythmik und Photoperiodismus aussprechen können, so sollten wir sie nicht ohne zwingende Gründe zugunsten anderer Annahmen preisgeben, die im günstigsten Fall nur eine Antwort auf *eines* der beiden Probleme geben können.

Zusammenfassung.

Nachdem dargelegt wird, wieweit der Verlauf der endogenen tagesperiodischen Schwankungen im photo- und skotophilen Charakter der Pflanzen schon aus dem bisher vorliegenden Versuchsmaterial geschlossen werden kann, wird über Versuche an Biloxi-Soja berichtet. Die skotophile Phase beginnt hier 10 Std nach dem Anfang der Lichtperiode. Sie erreicht ihr Maximum 6 Std später, also 16 Std nach Beginn der Lichtperiode. Dieser Verlauf der skotophilen Phase wurde durch Beobachtung des Einflusses von Störlicht in der Dunkelperiode ermittelt.

Der Verlauf der photophilen Phase ließ sich durch Versuche mit kurzen, zu verschiedenen Abschnitten dieser Phase gebotenen Lichtperioden bestimmen, wenn diese Lichtperioden mit normalen Lichtperioden alternierten. Die photophile Phase beginnt demnach anscheinend kurz vor der täglichen normalen Lichtperiode und sie erreicht ihr Maximum etwa 5 Std nach Beginn dieser Lichtperiode.

Der Beginn der skotophilen Phase deckt sich zeitlich mit dem endgültigen Übergang der Blätter in die Nachtstellung. Die Blatthebung beginnt bald nach dem Überschreiten des Maximums der skotophilen Phase. Das erste Maximum der Blatthebung deckt sich zeitlich ungefähr mit dem Maximum der photophilen Phase.

Während der photophilen Phase besteht zunehmende, während der skotophilen abnehmende Amylaseaktivität.

Bei Langtagpflanzen *(Hyoscyamus niger, Plantago lanceolata)* ist der mit der ausgesprochen photophilen Phase alternierende Abschnitt der endogenen Tagesrhythmik anscheinend weitgehend indifferent gegenüber dem Licht.

Die fördernde Wirkung des Lichtes in der photophilen Phase beruht möglicherweise auf der Hemmung des in dieser Phase starken Wuchsstoffabflusses.

Literatur.

Bezler, H., u. E. Bünning: Naturwiss. **37**, 92 (1950). — Bonner, J., and J. Thurlow: Bot. Gaz. **110**, 613 (1949). — Bünning, E.: Jb. Bot. **75**, 439 (1931). — Z. Bot. **37**, 433 (1942). — Flora **38**, 93 (1944). — Z. Naturforschg **3b**, 457 (1948). — Claes, H.: Diss. Tübingen 1945. — Claes, H., u. A. Lang: Z. Naturforschg **2b**, 56 (1947). — Ehrenberg, M.: Planta **38**, 244 (1950). — Flügel, A.: Planta (Berl.) **37**, 337 (1949). — Harder, R.: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. **1949**. — Harder, R., u. O. Bode: Planta (Berl.) **33**, 469 (1943). — Harder, R., u. G. Gümmer: Planta (Berl.) **37**, 12 (1949). — Harder, R., u. H. van Senden: Naturwiss. **36**, 348 (1949). — Laibach, F.: Ber. dtsch. bot. Ges. **1949**, 27. — Laibach, F., u. F. J. Kribben: Z. Naturforschg **4b**, 298 (1949); **5b**, 160 (1950). — Leopold, A. C., and K. V. Thimann: Amer. J. Bot. **36**, 342 (1949). — Parker, M. W., S. B. Hendricks and H. A. Borthwick: Bot. Gaz. **111**, 242 (1950). — Rasumov, W. S.: Timiriazew-Gedenkband der Akad. Wiss. USSR Moskau 1941, S. 283. — Resende, F.: Portugal. Acta Biol. A **2**, 251 (1948). — Snyder, W. E.: Amer. J. Bot. **35**, 520 (1948).

Prof. Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut.

Planta, Bd. 38, S. 541—563 (1950).

Aus dem Institut für Mikromorphologie. Gastabteilung im Kaiser-Wilhelm-Institut für physikalische Chemie und Elektrochemie, Berlin-Dahlem.

VERGLEICHENDE LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN OSZILLATORIEN.

Von

GOTTFRIED BRINGMANN.

Mit 24 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Juni 1950.)

Material und Methoden[1].

Das wesentlichste Problem des Baues des Protoplasten der Cyanophyceen faßt GEITLER in dem „Handbuch der Pflanzenanatomie" Band IV (1936) in der Frage zusammen „in welcher Weise die Zellorganisation der Blaualgen mit der Organisation der Zellen anderer Lebewesen vergleichbar" sei. Wir haben uns die Aufgabe gestellt, unter Verwendung moderner methodischer Hilfsmittel einen Beitrag zur Klärung dieser Frage zu leisten in spezieller Ausrichtung auf das Studium der kernäquivalenten Körper.

Die Aussaat der von uns als Untersuchungsobjekt verwendeten Oszillatorien erfolgt auf sterilisierter KNOPscher Nährlösung in Petrischalen. Wir verwendeten *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT und die mit ihr vergesellschaftete *Lyngbya amplivaginata* VAN GOOR. Beide Formen fanden wir in einem gemeinsamen Lager am Boden eines Aquariums.

Die Fixierung des Materials erfolgte meist mit 96%igem Alkohol, in einigen Fällen mit dem von BOIVIN empfohlenen Fixierungsgemisch nach CHABAUD. Die Verdauungsversuche sind mit Pepsin und Trypsin „Merck", Papain „Arbuz", Diastase „Merck", Speichelamylase, sowie Ribonuclease aus Rinderpankreas durchgeführt worden.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen brachten wir anfangs Einzelfäden mit Impföse auf den Zaponlackfilm der Objektblenden auf. Ferner entnahmen wir mit Präpariernadeln Stückchen des Algennetzes, das sich auf dem Boden der Petrischalen bildete.

[1] Herrn Prof. MELCHIOR habe ich für die Bestimmung der Arten und für wertvolle Anregungen, Fräulein Dr. D'ANS für ihre Unterstützung bei der Durchführung der elektronenmikroskopischen Arbeiten, Fräulein Dr. NECKEL für die Darstellung der Ribonuklease nach der Technik von KUNITZ, FISCHER und MCCARTY (zitiert bei BOIVIN) zu danken.

Fräulein HAUPT und Fräulein WERMBTER danke ich für die fototechnische Mitarbeit.

Die Algennetzstückchen übertrugen wir nach der Durchführung durch die Präparationsflüssigkeiten mit Präpariernadeln im Wassertropfen auf die Objektblenden.

Als erfolgreichste Methode erwies sich das direkte Auffangen von Fäden schwimmender Algennetze auf befilmte Objektblenden mit einer Hakenpinzette. Diese Art der Präparation ist von uns vorwiegend angewendet worden.

Die Fixierung, Fermentbehandlung und Hydrolyse der Präparate erfolgte für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen auf den Objektblenden, für die lichtmikroskopischen Untersuchungen auf den Objektträgern. An suspendiertem Material führten wir Kontrollversuche durch.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiß-Ultraphot unter Verwendung der Phasenkontrasteinrichtung von WINKEL-ZEISS, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit dem Siemens-Übermikroskop Typ 100b für 60—100 kV Beschleunigungsspannung nach E. RUSKA und B. v. BORRIES.

Untersuchungsergebnisse.

A. Lichtmikroskopische Untersuchungen.

a) Phasenkontrastbild.

An lebenden Objekten der Blaualge *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT ist im mikroskopischen Hellfeld nur eine feine Granulierung des Protoplasmas wahrnehmbar (Abb. 1). Bei Betrachtung im lebenden Zustand (oder nach einstündiger Fixierung mit Alkohol) im *Phasenkontrast*verfahren treten in den Zellen *helle* Körper hervor (Abb. 2 und 3). Sie können einzeln, doppelt und zu mehreren auftreten.

Das Phasenkontrastbild der Granula wird durch Trypsin „Merck" in der Weise beeinflußt, daß sich die Lichtphasen verschiebende Wirkung der abgebildeten Substanz ändert. Die Granula erscheinen nicht mehr als helle Körper, sondern erheblich *dunkler* als ihre Umgebung. Durch Trypsin „Merck" werden offenbar spezifische Stoffe, die das *helle* Phasenkontrastbild erzeugen, aus den Granula herausgelöst; andererseits liegen isotope Komplexe vor, die durch Trypsin (und auch durch Diastase) nicht abbaubar sind und ohne die durch Trypsin abbaubare Begleitsubstanz ein *dunkles* Phasenkontrastbild geben. Das dunkle Phasenkontrastbild schwindet nach Hydrolyse mit n-HCl, wie sie bei der Durchführung der FEULGEN- bzw. ROBINOW-PIEKARSKI-Kernfärbung üblich ist; weiterhin ist die durch das dunkle Phasenkontrastbild dargestellte Substanz in verdünnter Salpetersäure und verdünnter Kalilauge löslich.

Die stofflichen Anteile der Granula, die das *helle* Phasenkontrastbild liefern, entsprechen mithin in ihren chemischen Eigenschaften den *basophilen* Körpern, die Komplexe, die ein *dunkles* Phasenkontrastbild

Abb. 1. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT, lebend in Wasser. Hellfeld. Maßstab der Originalaufnahme 1000:1. Vergrößert auf 3600:1. Objektiv Winkel-Zeiß 90/1,3. Okular: Photookular 12mal. Filter Schott VG 6.

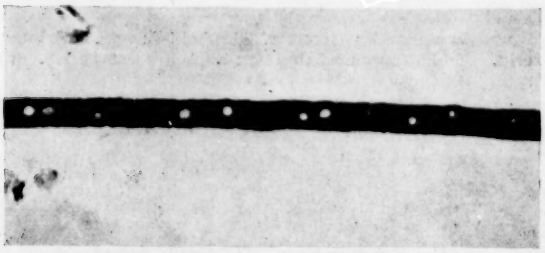

Abb. 2. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT, Alkoholfixierung. Cedernöl. Phasenkontrast. Abbildungsmaßstab 1200:1. Objektiv Winkel-Zeiß. Ph. 90/1,3. Okular: Homal IV. Filter Schott VG 4.

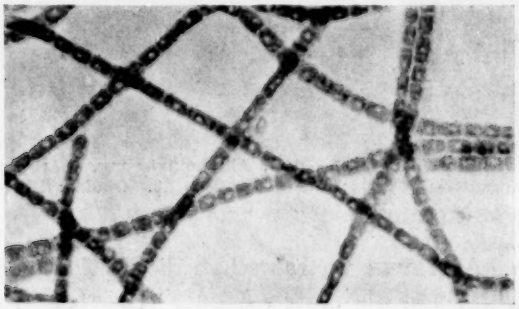

Abb. 3. *Lyngbya amplivaginata* VAN GOOR. Unfixiert. Wasser. Phasenkontrast. Abbildungsmaßstab 1200:1. Objektiv Winkel-Zeiß. Phako 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter Schott VG 6.

erzeugen, verhalten sich identisch mit den *elektronenmikroskopisch* darstellbaren Granula, wie unten näher berichtet werden wird.

b) Basophile Körper.

Nach unseren Feststellungen stimmt das Phasenkontrastbild örtlich mit den nach GIEMSA färbbaren *basophilen* Körpern überein

(Abb. 4 und 5), deren spezifische Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen bereits BÜTSCHLI, später NADSON u. a. nachgewiesen haben.

KOHL stellt in dem „Zentralkörper" sog. „Zentralkörner" fest. Die „Zentralkörner" werden von ihm mit den „Volutinkörnern" der Bakterien verglichen. Sie entsprächen den „roten Körnern" von BÜTSCHLI und NADSON, seien aber mit dem Chromatin des Kerns

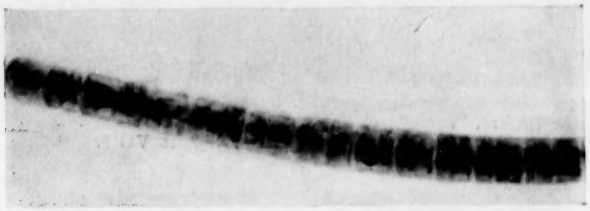

Abb. 4. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT, Alkoholfixierung. Färbung nach GIEMSA Eiweißglyzerin. Abbildungsmaßstab 1200:1. Achromat 90/1,3. Okular IV.

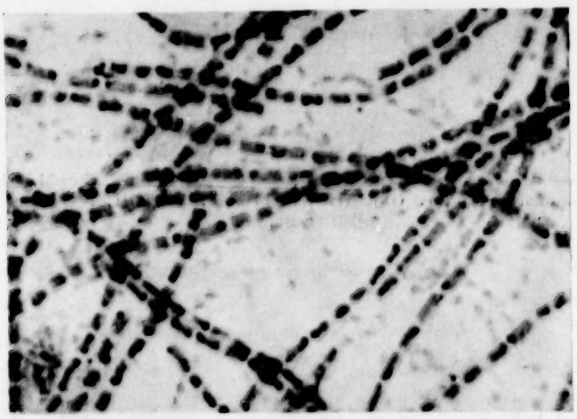

Abb. 5. *Lyngbya amplivaginata* VAN GOOR, Alkoholfixierung. Färbung nach GIEMSA Cedernöl. Abbildungsmaßstab 2000:1. Achromat 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter Schott GG 11.

nicht identisch. A. MEYER vertrat schon die Ansicht, daß die „Zentralkörner" (KOHL) und die „roten Körner" (BÜTSCHLI) dasselbe wie „Volutinkörnchen" seien. Den „Zentralkörper" betrachtet MEYER als eine mit „Volutin" und Eiweiß ausgestattete Vakuole, jedoch nicht als einen Zellkern. ELLENKIN und DANILOV nehmen an, daß die sog. „Metachromatinkörperchen" des peripheren Teils aus „Volutin" im Sinne MEYERS bestehen. GUILLIERMOND kommt zu dem Ergebnis, daß die „Volutin"-Körner ausschließlich in der „couche corticale" gelegen seien. Ihr Vorhandensein im „Zentralkörper" stellt sich GUILLIERMOND als eine sekundäre Erscheinung vor. OLIVE hat weder Fett noch Glykogen in den Granula nachgewiesen. POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY fanden durch Vitalfärbung mit Methylenblau, daß die „Meta-

chromatinkörper" sowohl im peripheren Plasma, in der Hauptsache jedoch im „Zentralkörper" bzw. in seiner unmittelbaren Nähe liegen. POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY sind der Meinung, daß die großen „Metachromatin"-Körner nicht ganz aus „Volutin" im Sinne MEYERS bestehen, sondern nur ihr peripherer Teil. Die kleinen „Metachromatin"-Körner würden nach POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY ausschließlich aus „Volutin" bestehen. Sie können häufig ganz fehlen. Hauptsächlich sind sie im „Zentralkörper", doch manchmal auch im peripheren Plasma in der Nähe des „Zentralkörpers" gelagert und haben regelmäßig Kugelform. Ihre Zahl ist nach PRAT von äußeren Bedingungen abhängig, bzw. ihre Verteilung vom Alter der Zelle (KOHL, ELLENKIN, DANILOV).

Nach unseren Untersuchungen besteht offenbar eine Beziehung zwischen dem Alter der Kultur, d. h. des Kulturmediums und der Größe und Zahl der basophilen Elemente. In frischen Kulturmedien, in denen die Zellteilung rasch und ungehemmt vor sich geht, findet man relativ große basophile Komplexe einzeln bzw. zu zweit in einer Zelle. Mit zunehmendem Alter der Kultur bzw. des Kulturmediums tritt offenbar eine Hemmung der Zellteilung ein, während die Vermehrung der basophilen Körper zunächst weitergeht, so daß sie zu mehreren in einer Zelle auftreten und ihre Zahl beträchtlich ansteigen kann, wobei sich gleichzeitig ihre Größe verringert.

Durch HCl-Hydrolyse wird die Giemsa-Färbbarkeit der basophilen Körper sowie das helle und das dunkle Phasenkontrastbild aufgehoben. In Übereinstimmung damit haben POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY eine Auflösung der sog. „Metachromatin"-Körperchen in Säuren erhalten. POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY weisen darauf hin, daß die Beziehungen der basophilen Körper zu Färbung und Lösungsmitteln mit den Reaktionen A. MEYERS am „Volutin" vergleichbar sind. MEYER vermutet bereits im Volutin eine Nukleinsäureverbindung.

c) Ribonukleinsäurekomplexe.

Es dürfte bei der Herauslösung der basophilen Körper durch HCl unter anderem ein Angriff auf die in den Körpern enthaltene *Ribonukleinsäure* erfolgen, deren färberischen Nachweis wir durch Färbung mit *Pyronin* erbracht haben (Abb. 6). Nach Angaben von ALTMANN kann in der Rotfärbung mit Pyronin nach den Untersuchungen von BRACHET der Beweis erblickt werden, daß die Basophilie bestimmter Plasmaelemente auf ihrem Gehalt an Ribonukleinsäure beruht. Die Annahme von Ribonukleinsäure in den basophilen Körpern wird dadurch gestützt, daß bereits MACALLUM in dem sog. „Zentralkörper" diffus verteilt organischen Phosphor nachgewiesen hat.

Auf Grund dieser Feststellung und von Verdauungsversuchen mit Magensaft kam er zu der Auffassung, daß die „Zentralkörper" Nukleinsäuren enthalten.

Wir nehmen an, daß die wechselnde Zahl und Größe der durch Pyronin färbbaren Körper der morphologischen Veränderung von Ribonukleinsäurekomplexen entspricht. Zur weiteren Beweisführung über die Natur der basophilen Körper ließen wir *Ribonuklease* aus Rinderpankreas in Anlehnung an die Methodik von BOIVIN auf Oszillatorienfäden, die vorher nach CHABAUD bzw. mit 96%igem Alkohol fixiert worden waren, einwirken. Wir stellten eine Aufhebung der Färbbarkeit der basophilen Körper wie einen Schwund des *hellen* Phasenkontrastbildes, jedoch ein Verbleiben des *dunklen* Phasenkontrastbildes der Färbbarkeit der basophilen Körper fest; eine Fermentbehandlung mit den *Proteinasen* Pepsin und Papain bewirkte dagegen *keinen* Schwund im obigen Sinne.

Abb. 6. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT, Alkoholfixierung. Färbung Pyronin. Cedernöl. Abbildungsmaßstab 1200:1. Objektiv Achromat 90/1,3. Photookular 12mal. Filter Schott BG 7, GG 11.

Aus diesen Ergebnissen ziehen wir gleichfalls den Schluß, daß die basophilen Körper Ribonukleinsäure bzw. Ribonukleinsäurekomplexe enthalten, die durch Ribonuklease fermentativ beeinflußt, durch Pepsin und Papain jedoch nicht angegriffen werden.

d) Desoxyribonukleinsäurekomplexe.

Die „*Metachromatinkörperchen*" der Cyanophyceen geben nach POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY *keine* Nuklealreaktion. Aus dieser Beobachtung schließen die Autoren, daß keine Nukleinsäure vom Typus der Desoxyribonukleinsäure in den „Metachromatinkörperchen" vorhanden sein könne. Ihre Befunde widersprechen zwar nicht unseren eindeutigen Feststellungen von *Ribonukleinsäure* in den basophilen Körpern, doch kamen wir hinsichtlich der *Desoxyribonukleinsäure* bei *unseren* Untersuchungsobjekten zu anderen Ergebnissen.

Unsere Färbeversuche nach FEULGEN gaben den von uns untersuchten Oszillatorien *bei vorausgehender HCl-Hydrolyse keine* Farbreaktion, im Gegensatz dazu erhielten POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY bei den von ihnen untersuchten Objekten *nach HCl-Hydrolyse* Feulgenpositive Strukturen im „Zentralkörper". Sie kamen zu dem Ergebnis, daß in den „*Zentralkörpern*" von Cyanophyceen eine Substanz vorhanden sei, die sowohl die Nuklealreaktion nach FEULGEN als auch

die Macallum-Reaktion zum Nachweis organischen Phosphors gibt und sich mit basischen Farbstoffen anfärbt. Die nach FEULGEN färbbare Substanz halten sie für einen obligatorischen Teil der Zelle. DRAWERT fand bei seinen Objekten teils bei *Anwendung* teils nur bei *Unterbleiben* der HCl-Hydrolyse Feulgen-positive Körper.

Offenbar liegen bei den Oszillatorien wechselnde Verhältnisse hinsichtlich der *Bindung* der Desoxyribonukleinsäure vor. Denn bei den von uns untersuchten Arten war nur *ohne* vorangegangene HCl-Hydrolyse oder nach *Vorbehandlung* der Zellen mit *Lanthan*-Azetat und *anschließender* HCl-Hydrolyse die Feulgen-Reaktion der vorhandenen Grana positiv (Abb. 8c), und es ergab sich *keine* Differenzierung in einen Feulgen-positiven „Zentralkörper" und „Feulgen-negative Metachromatinkörner" (wie POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY an *ihren* Objekten festgestellt haben) (Abb. 11).

Man kann annehmen, daß durch *Lanthan*-Salze eine Fällung der Desoxyribonukleinsäure eintritt, wie sie CASPERSSON in Chromosomen höher organisierter Kerne erhielt. Hierdurch wird ein stabiler Zustand geschaffen, der den positiven Ausfall einer lokalisierten Feulgen-Reaktion ermöglicht; während *ohne* Lanthan-Fällung die Desoxyribonukleinsäure (bzw. Desoxyribosephosphorsäure), die *nicht* oder nur lose gebunden vorliegt (REICHENOW[1]), durch HCl-Hydrolyse herausgelöst und damit die normalen Bedingungen für eine lokalisierte, positive Feulgen-Reaktion aufgehoben werden.

An geeigneten Objekten hatten wir im Vergleichsverfahren festgestellt, daß die normale Feulgen-Reaktion durch Lanthan-Azetatvorbehandlung der Kerne nicht gestört wird. Nach 24stündiger Alkoholbehandlung blieb bei unseren Untersuchungen die Feulgen-Reaktion wie bei POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY positiv. Demnach kann es sich auch bei den von uns nachgewiesenen Feulgen-positiven Körpern nicht um „Plasmal"-Färbungen handeln. Durch Amylaseeinwirkung (Speichel) wird die Feulgen-Färbbarkeit nicht aufgehoben. Mithin kann keine Polysaccharid-Färbung vorliegen; letztere würde außerdem eine Chromsäurefixierung als Grundlage bedingen. Es ist nicht anzunehmen, daß eine andere Substanz mit Aldehydgruppe gefällt wird als Desoxyribonukleinsäure.

Für die färberische Darstellung der Kerne höher organisierter Zellen gilt die *Methylgrün*färbung als besonders charakteristisch. Nach PAPPEN-

[1] Einige Protozoenkerne geben nach den Untersuchungen REICHENOWS die Nuklealreaktion nach FEULGEN *ohne* vorhergehende Hydrolyse, und die Feulgen-positive Substanz wird *durch HCl-Hydrolyse herausgelöst*. REICHENOW nimmt das Vorliegen *freier* Thymonukleinsäure an und hält letztere für einen Bestandteil des „Volutins".

HEIM kann durch Methylgrün-Pyronin-Färbung das „Chromatin" (grün) vom „Plastin" (rot) der Zelle unterschieden werden, da Methylgrün von allen substantiv färbbaren oxyphilen und basophilen Substanzen nur das Chromatin färbt. Eine kombinierte Methylgrün-Pyronin-Färbung ergab bei den von uns untersuchten Objekten eine dunkle Rotfärbung der basophilen Körper. Eine eventuell vorliegende überdeckte Färbung durch Methylgrün konnte daher nur isotop zur Pyroninfärbung erfolgt sein. Färbten wir lebende Objekte mit Methylgrün-Essigsäure (v. PLOTHO), so erhielten wir eine charakteristische blaugrüne Färbung der basophilen Körper (Abb. 7).

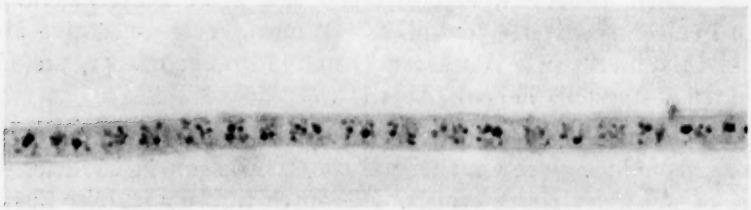

Abb. 7. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT, Alkoholfixierung. Färbung Methylgrün. Cedernöl. Abbildungsmaßstab 1200:1. Objektiv Achromat 90/1,3. Photookular 12mal. Filter Schott GG 11.

Nach POLLISTER und LEUCHTENBERGER färbt Methylgrün hochspezifisch *Desoxyribonukleinsäurekomplexe*. Nach den Autoren besteht eine quantitative Beziehung zwischen dem Gehalt an Desoxyribonukleinsäure und der Extinktion der durch Methylgrün absorbierten Lichtmenge bestimmter Wellenlänge. Nur Desoxyribonukleinsäurekomplexe eines *bestimmten Polymerisationsgrades* geben mit Methylgrün einen Färbeeffekt. Der große Vorteil des Desoxyribonukleinsäurenachweises mit Methylgrün liegt unserer Meinung nach darin, daß eine HCl-Hydrolyse zur Entfernung von Ribonukleinsäure bzw. zur Abspaltung der Purinkörper der Desoxyribonukleinsäure nicht notwendig ist. Auf diese Weise kann auch freie bzw. lose gebundene Desoxyribonukleinsäure färberisch nachgewiesen werden, die bei dem Feulgen-Verfahren durch HCl-Hydrolyse herausgelöst bzw. zerstreut wird.

Die Methylgrünfärbung der basophilen Körper wird nach HCl-Hydrolyse negativ. Das bedeutet, daß die vorliegenden Desoxyribonukleinsäurekomplexe herausgelöst bezw. zerstreut werden, wie bereits bei der Feulgen-Reaktion erwähnt worden ist.

e) Das kombinierte Nukleinsäuresystem der Karyoide.

Wie oben erwähnt, geben Pyronin und Methylgrün offenbar isotope Färbeeffekte in den basophilen Körpern.

Weiterhin erhielten wir bei einer *sukzessiven* Färbung mit Pyronin und Feulgens Reagens in *gleicher* Lage mit den durch Pyronin färbbaren (Ribonukleinsäure enthaltenden) Körnern, die auf Grund ihres Gehaltes an Desoxyribonukleinsäure mit Feulgens Reagens sich anfärbenden

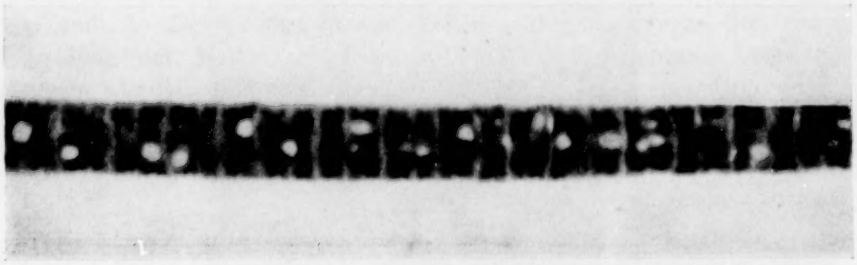

Abb. 8a. *Lyngbya aerugineo-coerulea* Gomont, Alkoholfixierung. Aqua dest. Phasenkontrast. Maßstab der Originalaufnahme 1200:1. Vergrößert auf etwa 2500:1. Winkel-Zeiß. Phako 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter Schott VG 6.

Abb. 8b. Der gleiche Faden wie bei Abb. 8a. Pyronin. Maßstab der Originalaufnahme 1200:1. Vergrößert auf etwa 2500. Winkel-Zeiß 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter Schott BG 7 + GG 11.

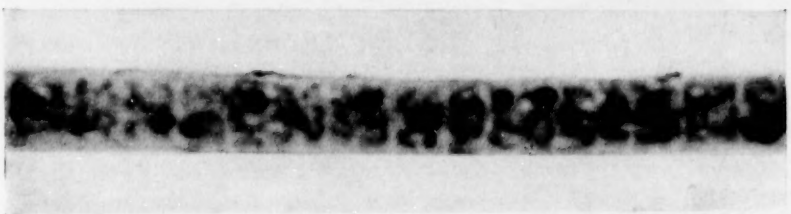

Abb. 8c. Der gleiche Faden wie bei Abb. 8a. Feulgen. Maßstab der Originalaufnahme 1200:1. Vergrößert auf etwa 2500. Winkel-Zeiß 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter Schott VG 6. (Das Objekt ist nach der Pyroninfärbung entfärbt worden, hierbei erfolgt eine sekundäre Quellung der färbbaren Körper.)

Komplexe. Die Zellelemente erschienen im Vitalzustand vor der Färbung im Phasenkontrastbild als helle Körper (Abb. 8a—c). Demnach dürften die *basophilen* Körper Grana-Aggregate darstellen, die außer *Ribonukleinsäurekomplexen* isotope *Desoxyribonukleinsäurekomplexe* enthalten und gleichzeitig dem *Phasenkontrastbild der hellen Körper* im *Vital*zustand isotop sind.

Die Feulgen-positiven Körper halten wir auf Grund ihres Nukleinsäuresystems (und seiner durch unsere Verdauungsversuche nach-

gewiesenen Beständigkeit gegen Pepsin sowie seine Abbaubarkeit durch Trypsin „Merck" bzw. Nukleasen), weiterhin auf Grund ihrer Kontinuität in der Zellteilungsfolge, die sich durch amitotische Teilungsvorgänge

Abb. 9. *Lyngbya aeruginco-coerulea* GOMONT. Amitotische Teilungsstadien des Karyoids. Alkoholfixierung. Färbung nach FEULGEN. Cedernöl. Maßstab der Originalaufnahme 1200:1. Vergrößert auf 2800:1. Objektiv Achromat 90/1,3. Photokular 12mal. Filter VG 6.

(Abb. 9) und mit ihnen in Verbindung stehende Zellteilungsvorgänge (Abb. 10) ergibt, für Kernäquivalente. Um den (unten näher definierten) Unterschied zu den höher organisierten Kernen zum Ausdruck zu bringen, bezeichnen wir die Kernäquivalente als *Karyoide*.

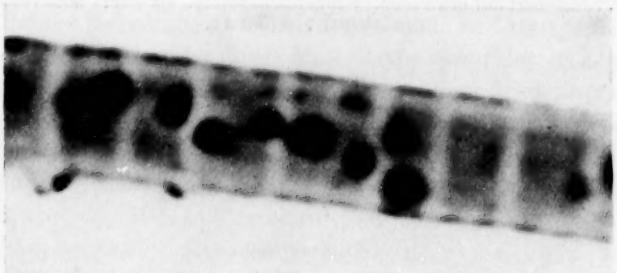

Abb. 10. *Lyngbya aeruginco-coerulea* GOMONT. Beginnende Teilung von Zellen mit 2 Karyoiden. Alkoholfixierung. Färbung nach FEULGEN. Cedernöl. Maßstab der Originalaufnahme 1200:1. Vergrößert auf 3600:1. Objektiv Achromat 90/1,3. Photookular 12mal. Filter V G6.

Die morphologische Ausprägung der Karyoide, die sowohl in Einzahl (Abb. 8c), doppelt (Abb. 9) als auch in Vielzahl (Abb. 11) in den Zellen auftreten können, offenbart zwar *quantitative* Unterschiede im Sinne wechselnder Größe, aber keine *qualitativen* und damit wohl auch funktionellen Unterschiede der Einzelelemente. Die häufig auftretende *Polykaryoidie* erklärt sich wahrscheinlich aus einer nur losen, durch Außenfaktoren beeinflußbaren Korrelation zwischen Karyoid- und Zellteilungsvorgängen.

Die Art des Vorkommens der *Desoxyribo*nukleinsäure in Vergesellschaftung mit der leicht zu entfernenden *Ribo*nukleinsäure und in gleichfalls leicht herauslösbarer Form (HCl-Hydrolyse; Zerstreuung durch *Ribo*nuklease bei fermentativer Herauslösung der *Ribo*nukleinsäure) wird nach den neueren Ergebnissen der Chemie der Kernteilung verständlich. Der Teilung höherer Zellen geht nach LETTRÉ eine Verdoppelung der Menge der Desoxyribonukleinsäure voran. Letztere entsteht aus Ribonukleotiden, die exogenen oder endogenen Ursprungs sein können. Nach BRACHET und MITCHELL (zitiert durch LETTRÉ) kann im Kern eine Reduktion von Ribose zur Desoxyribose stattfinden.

Die leichte Herauslösbarkeit der Desoxyribonukleinsäurekomplexe der Karyoide steht in guter Übereinstimmung zu der auf anderem Wege gewonnenen Hypothese BOIVINS, daß die Desoxyribonukleinsäuren des Bakterienkerns in ihrem ursprünglichen Zustand hochpolymer in Lösung gehen und als Makromoleküle unter Erhaltung ihrer spezifischen Geneigenschaften in Funktion treten können.

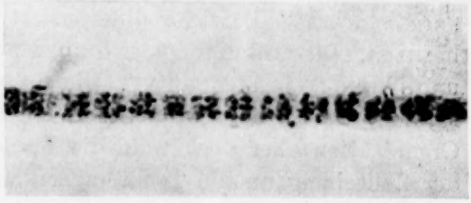

Abb. 11. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Polykaryoider Zellfaden. Alkoholfixierung. Färbung nach FEULGEN Cedernöl. Abbildungsmaßstab 1200:1. Objektiv 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter VG 6.

MALMGREN und HEDEN schreiben den Bakterien den gleichen Zellkernmechanismus zu wie ihn CASPERSSON und Mitarbeiter für höher organisierte Zellen nachgewiesen haben. Die beiden Nukleinsäuresysteme würden eine *funktionelle* Einheit darstellen, seien aber bei den Bakterien insofern *nicht* zu einer *morphologischen* Einheit verbunden, als der Desoxyriboseanteil dem Euchromatin des höher organisierten Kerns, das Ribonukleinsäuresystem im Cytoplasma dem Heterochromatin entspräche. CASPERSSON hält eine phylogenetische Entwicklung der Zellkerne für möglich. Das *einfachste* Virus besteht aus einem einheitlichen Eiweißkörper und enthält Ribonukleotide; Bakterien enthalten eine Anzahl sich selbst reproduzierender Elemente, zu deren Vermehrung der Desoxyribosemechanismus entwickelt wird. *Wir würden ergänzend einfügen, daß bei den von uns untersuchten Oszillatorien das Ribonukleinsäuresystem und der Desoxyribosemechanismus bereits isotop sind und somit eine morphologische Einheit darstellen und gleichzeitig einen Übergang zu den Verhältnissen in höheren Zellen bilden, in denen der Heterochromatinanteil in die Chromosomenstruktur einbezogen ist* (CASPERSSON).

Unsere Untersuchungsergebnisse an Oszillatorien decken sich nur zum Teil mit denjenigen anderer Autoren. BÜTSCHLI bereits hält —

auf Grund basophiler Färbung — ebenso WAGER — den „Zentralkörper" für einen primitiven „Kern". Die Teilung des „Zentralkörpers" beschreiben sie als amitotisch. GARDNER vergleicht den „Zentralkörper" gleichfalls mit einem Zellkern, der sich amitotisch teilt. ACTON stellt eine rein amitotische Kernteilung fest und glaubt aber gleichzeitig eine Reihe verschieden hoch entwickelter Kerntypen aufstellen zu können. HOLLANDE hat kernartige Gebilde (Nukleosomen) mit amitotischer Teilung beobachtet. Unseren Feststellungen am nächsten kommen HAUPTS Versuchsergebnisse, insofern *kein* differenziertes Zentralorgan im Sinne eines „*Zentralkörpers*" oder „*Zellkerns*" vorliegt, sondern eine färbbare Substanz in Form von *Grana*, die *nicht* in „*chromatische*" und „*achromatische*" Bereiche differenziert sind und keine Kernmembran besitzen. Die Grana teilen sich auch nach HAUPTS Angaben amitotisch und „have no individuality". Die chromatische Substanz besitzt seiner Meinung nach, die wir mit unseren Ergebnissen bestätigen, nicht die Organisation aber doch wohl die Funktion eines Kerns. Sie wird bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

B. Elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Normalerweise erscheinen die Zellfäden der Cyanophyceen auch bei hoher Elektronenbeschleunigungsspannung (100 kV) elektronenoptisch undurchstrahlbar (Abb. 12). Nur zwischen den Zellwänden sind mitunter Aufhellungen vorhanden, die besonders deutlich bei einer osmotisch bedingten Kontraktion des Zellinhaltes werden. Nach Graphitierung durch *extrem* starke Elektronenbestrahlung hinterläßt die Zellsubstanz ein dunkles, wabiges Gerüst (Verkokung) (Abb. 13).

Durch Diastase „Merck" bzw. Speichelamylase erfolgt eine elektronenoptische Aufhellung der Zellen, unter Verbleiben dunkler Grana (Abb. 14), während Trypsin „Merck" keine Aufhellung bewirkt. Es dürfte demnach vorwiegend die Herauslösung eines Kohlenhydrats erfolgen; nach unseren Untersuchungen (vgl. DRAWERT) liegt diffus verteiltes Glykogen vor, da lichtmikroskopisch mit Jod-Jod-Kalium eine Braunfärbung des Zellinhaltes feststellbar ist. Das elektronenmikroskopische Bild der Graphitierung des Glykogens (Abb. 16) gleicht dem Bild, das man bei der Graphitierung von Stärke erhält (Abb. 17).

Deutlich unterscheidbar heben sich neben dem blasig veränderten Graphitgerüst des Glykogens die zum Teil zersetzten elektronenmikroskopisch sichtbaren Dunkelkörper ab (Abb. 16), die nach fermentativer Herauslösung des Glykogens zurückbleiben. Sie ähneln den elektronenmikroskopisch sichtbaren Anteilen der „Volutin"-Körnern der Bakterien und sind wie diese unter Hinterlassung heller Lücken durch Elektronenstrahlen zerstörbar (Abb. 16 und 18). *Die dunkel erscheinenden Körper in elektronenmikroskopisch durchstrahlbaren Zellen*

erwiesen sich nach unseren Untersuchungen isotop mit den basophilen Grana, d. h. den Karyoiden (Abb. 19a, b und 20a, b). Sie werden einzeln, doppelt und zu mehreren in Zellen, die nach Diastaseeinwirkung oder gelegentlich auch spontan reservestofffrei sind, sichtbar und

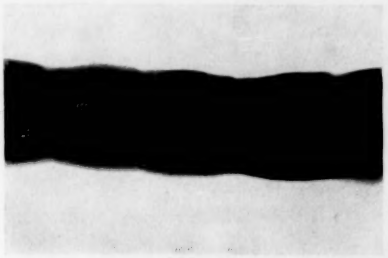

Abb. 12.

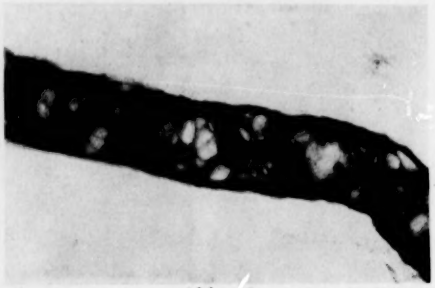

Abb. 13.

Abb. 12. *Lyngbya aerugineo-coerulea* Gomont. Elektronenbild 110 kV. Abbildungsmaßstab 3000:1.

Abb. 13. *Lyngbya aerugineo-coerulea* Gomont. Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 2400:1. Graphitierung des Glykogens durch extrem starke Elektronenbestrahlung.

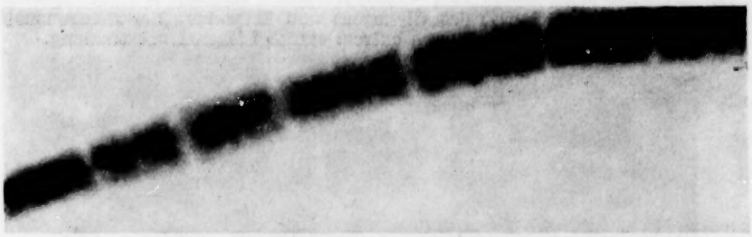

Abb. 14. *Lyngbya aerugineo-coerulea* Gomont. Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 2400:1. Fermentbehandlung mit Diastase.

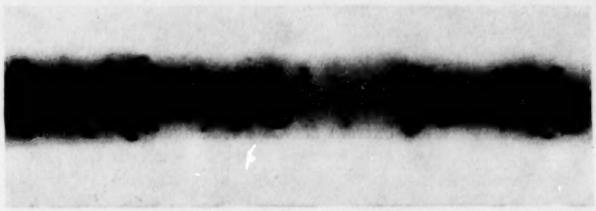

Abb. 15. *Lyngbya aerugineo-coerulea* Gomont. Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 2400:1. Spontan durchstrahlbarer Faden.

wechseln in ihrer Zahl und Größe (Abb. 14 und 15). Ihr Durchmesser schwankt nach unseren Messungen zwischen 1500 mμ und 150 mμ oder weniger. Häufig liegen die Grana im Bereich der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze bzw. unterhalb derselben. Somit wird verständlich, daß von älteren Autoren die lichtmikroskopisch nicht in Einzelgrana aufzulösenden Komplexe als „chromatische Strukturen", „Chromosomen" usw. gedeutet worden sind.

Bei nachträglicher Behandlung der nach Diastase- und Trypsineinwirkung im Elektronenbild beobachteten intakten Körper mit

n-Salzsäure (30 min bei 60° C) werden diese total herausgelöst. An ihren Orten verbleiben völlig substanzfreie Felder (Abb. 21). In Diphtheriebakterien haben WINKLER und KÖNIG in schmelzbaren Anteilen der die

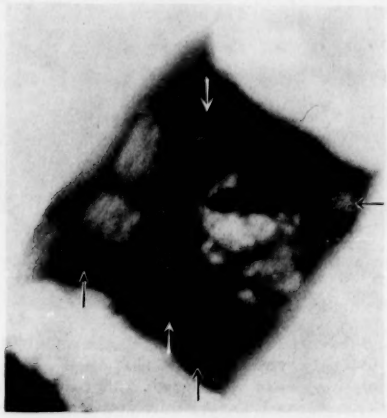

Abb. 16. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 7000:1. Graphitierung des Glykogens und Zersetzung der elektronenoptisch sichtbaren Dunkelkörper durch extrem starke Elektronenbestrahlung.

Abb. 17. Roggenstärke. Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 5000:1. Graphitierung durch extrem starke Elektronenbestrahlung.

Abb. 18. *Lyngbya aerugineo-coerulea.* Elektronenbild 100 kV. Abbildungsmaßstab 3000:1. Zersetzung der elektronenmikroskopisch sichtbaren dunklen Körper durch extrem starke Elektronenbestrahlung.

Elektronenstrahlen stark streuenden Grana nach *Säure*extraktion Calcium- und *Phosphat*-Ionen identifiziert, die nach ihren Feststellungen in organischer Bindung vorliegen. Nach EBEL wird bei Diphtheriebakterien durch *HCl-Hydrolyse* sowohl ein *Schwund der metachromatischen Grana* bewirkt, wie auch *Metaphosphorsäure* herausgelöst.

MINCK und MINCK führen an, daß die cytoplasmatischen Verdichtungen gewisser Bakterien *gleichzeitig Ribonukleinsäure und*

Abb. 19a.

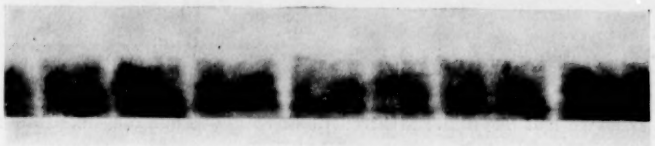

Abb. 19b.

Abb. 19a. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Alkoholfixierung. Färbung nach GIEMSA. Aqua dest. Maßstab der Originalaufnahme 1000:1. Nachvergrößerung 2200:1. Objektiv 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter BG 7. (Die Aufnahme des Objekts erfolgte von dem Zaponlackfilm der Objektträgerblende und gestattete insofern keine optimale lichtoptische Darstellung.)

Abb. 19b. Der gleiche Faden wie Abb. 20a. Elektronenbild 100 kV. Maßstab der Originalaufnahme 1000:1. Vergrößert auf 2200:1.

Abb. 20a.

Abb. 20b.

Abb. 20a. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Alkoholfixierung. Färbung nach GIEMSA. Aqua dest. Maßstab der Originalaufnahme 1000:1. Vergrößert auf 3000:1. Objektiv 90/1,3. Okular: Photo 12mal. Filter BG 7.

Abb. 20b. Der gleiche Faden wie bei Abb. 21a. Elektronenbild 100 kV. Maßstab der Originalaufnahme 1000:1. Vergrößert auf 3000:1.

Abb. 21. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Elektronenbild 80 kV. Abbildungsmaßstab 3500:1. Elektronenmikroskopisch sichtbare Körper durch n-Salzsäure herausgelöst.

Metaphosphorsäure enthalten. Bei *enzymatischem* Abbau der Ribonukleinsäure nehmen sie eine Zerstreuung der Metaphosphorsäure an.

Bei den Oszillatorien macht sich nach Entfernung des Glykogens durch Diastase die normalerweise nicht sichtbar werdende Wirkung

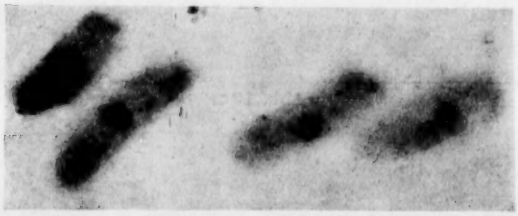

Abb. 22. Saprophytische Wasserbakterien. „Volutin"-Körner nach Fermentbehandlung mit Diastase *und* Trypsin. Elektronenbild 80 kV. Abbildungsmaßstab 12000:1.

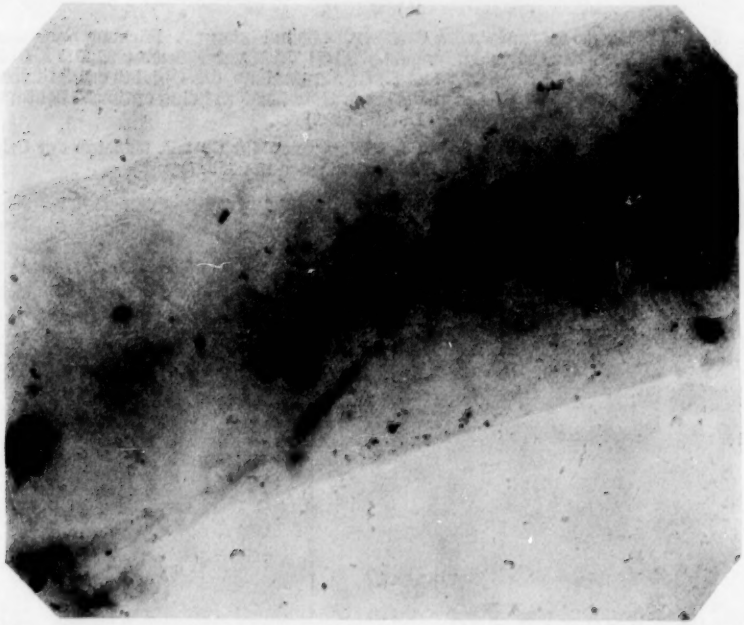

Abb. 23. *Lyngbya aerugineo-coerulea* GOMONT. Nach Fermentbehandlung mit Diastase *und* Trypsin. Elektronenbild 80 kV. Abbildungsmaßstab 9000:1.

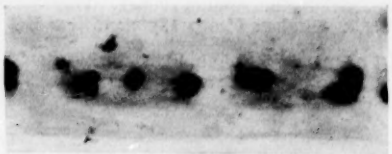

Abb. 24. *Lyngbya amplivaginata* VAN GOOR. Nach Fermentbehandlung mit Diastase *und* Trypsin. Elektronenbild 80 kV. Abbildungsmaßstab 8000:1.

von Trypsin „Merck" in einer ergänzenden elektronenmikroskopischen Aufhellung der Zellen durch Herauslösung der abgebauten Substanzen bemerkbar. Die *elektronenmikroskopisch* sichtbaren Körper bleiben jedoch erhalten. Offenbar tritt nur eine Zerstreuung der peripheren

Teile ein, so daß die regelmäßige Kugelform verlorengeht. Da Kohlenhydrate, Proteine bzw. die organischen Bestandteile der Nukleinsäurekomplexe der Karyoide fermentativ herausgelöst sind, können die nach Behandlung von Oszillatorien und saprophytischen Wasserbakterien mit Trypsin „Merck" bzw. Ribonuklease elektronenmikroskopisch sichtbar verbleibenden, durch verdünnte Säuren und Alkalien herauslösbaren Körper sehr wahrscheinlich als mineralische (Phosphat-)Reste der Karyoide gelten. Die *fakultative metachromatische* Färbbarkeit der isotopen *basophilen* Körper mit Toluidinblau dürfte nach VIAMES Untersuchungsergebnissen an Hefen auf das Vorliegen von *Meta*phosphatkomplexen hindeuten. Es wäre damit eine Beziehung der Oszillatorien zu *den* Bakterien gegeben, bei denen äquivalente elektronenmikroskopisch sichtbare bzw. metachromatisch färbbare Körner nachweisbar sind (Abb. 22, 23 und 24).

Die Massendicke der elektronenmikroskopisch sichtbaren Grana in spontandurchstrahlbaren nicht fermentativ behandelten Zellen unterscheiden sich *nicht* von der der Grana nach Diastase-Trypsin- (bzw. Ribonuklease-)Behandlung. Die Elektronenstreuung der Phosphatkomplexe ist offenbar so groß, daß die ihr isotopen Nukleoproteidkomplexe bzw. Proteine keine zusätzliche Schwärzung im elektronenmikroskopischen Bild hervorrufen.

C. Vergleichende Übersicht.

Abschließend sei eine Übersicht über die durchgeführten Untersuchungsreihen und die Isotopie der in ihnen dargestellten Objekte gegeben, sowie über die physikalischen Grundlagen des jeweiligen Abbildungsverfahrens.

Tabelle 1.

Histologische Darstellungsverfahren	Dargestelltes Objekt	Isotopie der dargestellten Zellelemente in verschiedenen Versuchsreihen an identischen Zellfäden		
		Reihe I	Reihe II	Reihe III
Methylgrünfärbung[1]	Desoxyribonukleinsäure (Vitalzustand)	●		
Phasenkontrastbild	Vitalzustand	●	●	
Pyroninfärbung[1]	Ribonukleinsäure		●	
Feulgen-Färbung[1]	Desoxyribonukleinsäure		●	
Toluidinblau bzw. Giemsa-Färbung[1]	Basophile Substanzen[2]		●	●
Elektronenstreubild (nach fermentativem Abbau der organischen Substanzen)	Mineralische Substanz [(Meta-)Phosphatkomplexe]			●

[1] Amplituden- bzw. Frequenzbild.
[2] Substantive Färbung: Nucleinsäuren.
Metachromatische Färbung: Metaphosphatkomplexe.

Das Verhalten der isotopen Komplexe in der histologischen Darstellung bei der Anwendung histochemischer Reagenzien ist in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2.

Histologische Darstellungsverfahren	Histologische Darstellungsmöglichkeit bei Anwendung von					
	HCl-Hydrolyse		Trypsin bzw. Ribonuklease		Pepsin bzw. Papain	Diastase bzw. Speichel-Amylase
	Lanthan ohne	Lanthan mit	Lanthan ohne	Lanthan mit		
Phasenkontrast	—		(+)[1]		+	+
Pyronin . . .	—	+	—	+	+	+
Feulgen	—	+	—	+	+	+
Giemsa	—	+	—	+	+	+
Elektronenbild	—		+			+

[1] Dunkles Phasenkontrastbild.

Zusammenfassung und Diskussion.

An Cyanophyceen der Gattung *Lyngbya* durchgeführte Phasenkontrastuntersuchungen in Verbindung mit der Beobachtung von spezifischen Färbe-, Ferment- und histochemischen Verfahren im Lichtmikroskop sowie elektronenmikroskopische Befunde führen *nicht* zur Bestätigung des Vorkommens eines „Zentralkörpers" und von diesem differenzierter „Plasten" (BAUMGÄRTEL) bzw. „Metachromatinkörperchen" (POLJANSKY und PETRUSCHEVSKY). Festgestellt werden hingegen quantitativ verschieden große, qualitativ gleich zusammengesetzte komplexe Gebilde, die entsprechenden Zellorganen der Bakterien (MINCK und MINCK) insofern äquivalent sein dürften als sie Ribonukleinsäure enthalten und isotop mit ihr einen elektronenmikroskopisch nachweisbaren, durch Amylase, Trypsin bzw. Ribonuklease nicht angreifbaren, durch verdünnte Säuren und Alkalien dagegen herauslösbaren weiteren Bestandteil, der wahrscheinlich analog den Verhältnissen bei den Diphtheriebakterien (KÖNIG und WINKLER, EBEL, MINCK und MINCK) aus Phosphatkomplexen mit einem durch fakultative metachromatische Färbung mit Toluidinblau nachweisbaren Metaphosphatanteil (VIAME) bestehen dürfte und als mineralischer Rest bzw. als Vorstufe des Nukleinsäuresystems zu deuten wäre.

Die Methylgrünfärbung, der positive Ausfall der Feulgen-Reaktion (nach Fällung der Desoxyribonukleinsäure mit Lanthan-Azetat) sowie das Verhalten der Feulgenpositiven Körper gegenüber Fermenten führen andererseits zur Annahme von Desoxyribonukleinsäure enthaltenden, den Ribonukleinsäurekomplexen isotopen Komponenten, die sich amitotisch teilen und ihre Kontinuität im Zellteilungsverlauf bewahren.

Man kann annehmen, daß die als Karyoide der Oszillatorien zu bezeichnenden kernäquivalenten Zellorganelle auf Grund ihrer morphologischen Ähnlichkeit in Beziehung stehen zu *den* Zentren in Bakterien, die wir als Orte isotoper Giemsa-, Pyronin-, Feulgen- und Methylgrünfärbung definiert haben.

Es erhebt sich die Frage, inwieweit der elektronenmikroskopisch sichtbare Anteil der Karyoide der Oszillatorien vergleichbar ist mit elektronenmikroskopisch feststellbaren Körpern in Bakterien, die Gegenstand unserer weiteren Untersuchungen sind. Dem Aufbau nach *nicht* identisch sind die Karyoide mit dem bei der Coli-Typhusgruppe vorliegenden elektronenmikroskopischen Bild der *polaren* Verdichtungen (Piekarski, Ruska), die nach unseren Untersuchungen durch Trypsin „Merck" abgebaut, durch Nuklease nicht verändert werden, außerdem durch Elektronenstrahlen nicht zersetzbar und durch HCl-Hydrolyse nicht herauslösbar sind.

Die Karyoide lassen sich mit der von Mudd und Smith gegebenen elektronenmikroskopischen Darstellung der „Kernäquivalente" der Colibakterien, die bei Osmiumfixierung als *helle* Bläschen in dem dunklen Plasma erscheinen, ebenfalls nicht vergleichen.

Vergleichbare elektronenmikroskopische Beziehungen der Karyoide bestehen hingegen zu den elektronenmikroskopisch sichtbaren, den basophilen Körnern isotopen Einschlüssen diphtheritischer Bakterien (König und Winkler, Bringmann). Staphylokokken, Mycobakterien (Ruska), saprophytischer Wasserbakterien u. a. elektronenmikroskopisch sichtbare Körner enthaltender Formen, bei denen elektronenmikroskopisch eine Herauslösung durch verdünnte Säuren und Alkalien bzw. Zersetzbarkeit durch Elektronenstrahlen dargestellt worden ist.

Von den Kernen höher organisierter Zellen unterscheiden sich die Karyoide der Oszillatorien durch die Art des Vorkommens der Nukleinsäuren und den Aufbau des Nukleinsäuresystems, das Fehlen eines mitotischen Apparates, einer Kernmembran und durch die Form der Teilung. Gemeinsam mit den Kernen höher organisierter Zellen ist ihnen die *morphologische* Einheit der beiden Nukleinsäuresysteme, die Teilung vor der Zellteilung, sowie die Kontinuität in der Zellteilungsfolge.

Literatur.

Acton, E.: Observations on the cytology of the Chroococcaceae. Ann. of Bot. **28** (1914). — Altmann: Über die Abgabe von Kernstoffen in das Protoplasma der menschlichen Leberzelle. Z. Naturforschg **4b** (1949). — Baumgärtel, O.: Das Problem der Cyanophyceenzelle. Arch. Protistenkde **41** (1920). — Baylor, M. B., M. D. Appleman, O. H. Sears and G. L. Clark: Some morphological characteristics of nodule bacteria as shown by the electron microscope. II. J.

Bacter. **50**, 249 (1945). — BIELIG, H., G. A. KAUSCHE u. H. HAARDICK: Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakterien. Z. Naturforschg 4b, 2 (1949). — BISSET, K. A.: Nuclear reorganization in non-sporing bacteria. J. of Hyg. **46**, (1948). — Observations upon the bacterial nucleus. J. of Hyg. **46**, 264 (1948). — The cytology of the gram-positive Cocci. J. gen. Microbiol. **2**, 126 (1948). — Nuclear fusion and reorganization in a Lactobacillus and a Streptococcus. J. gen. Microbiol. **2**, 248 (1948). — Observations upon the cytology of Corynebacteria and Mycobacteria. J. gen. Microbiol. **3**, 93 (1949). — BOIVIN, A. R., TULASNE et R. MINCK: Sur la succession, dans le temps, des processus histologiques et biochimiques qui conditionnent la division de la cellule bactérienne, C. R. Acad. Sci. (Paris) **226**, 1869 (1948). — BOIVIN et R. VENDRELY: Le noyau des bactéries. Cytologie et cytochimie des bactéries normales et des bactéries traitées par la pénicilline. Arch. Sci. Physiol. **1**, 307 (1947). — Der Kern der Bakterien. Extrait des Archives des Sciences physiologiques. 1947. — Le noyau des bactéries Presse méd. **1948**, No 37. — BRACHET: Der histochemische Nachweis der Pentose-Nucleinsäure. C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **133**, 88, 90 (1940). — Enzymologia (Den Haag) **10**, 87 (1941). — Arch. Biol. **53** (1941). — BRINGMANN, G.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Natur der BABES-ERNST-Granula von Corynebacterium Diphtheriae. Zbl. Bakter. **1950**. — BÜTSCHLI, O.: Über den Bau der Bakterien und verwandter Organismen. Leipzig 1890. — Weitere Ausführungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Leipzig 1896. — Notiz über Teilungszustände des Zentralkörpers bei einer Nostocacee usw. Verh. nat.-med. Ver. Heidelberg 1898. — Bemerkungen über Cyanophyceen und Bakteriaceen. Arch. Protistenkde 1 (1902). — CASPERSSON, T.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **73**, Suppl. Nr 8 (1936). — Die Eiweißverteilung in den Strukturen des Zellkerns. Chromosoma **1**, 562 (1940). — Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. Naturwiss. **1941**. 33. — CASPERSSON u. Mitarb.: Trans. Faraday Soc. **31**, 367 (1935). — Naturwiss. **1935**, 30. — CASPERSSON u. K. BRAND: Nucleotidumsatz und Wachstum bei Preßhefe. Protoplasma (Berl.) **35**, 507 (1941). — DA CUNHA, A., et J. MUNIZ: La réaction nucléaire de Feulgen chez les Protozoaires. Kinétonucleus et appareil parabasal. C. R. Soc. Biol. Paris **99**, 1339 (1928). — Réaction de Feulgen chez les Spirochêtes et les Bactéries. C. R. Soc. Biol. Paris **100**, 951 (1929). — DANGEARD, P. A.: Observations sur le vacuome des Cyanophycées. R. C. Acad. Sci. Paris **197** (1933). — DEHORNE, A.: Contribution à l'etude comparée de l'appareil nucléaire des infusoires etc. Archives de Zool. **60** (1920). — DELAPORTE, B.: Recherches cytologiques sur les bactéries et les cyanophycées. Rev. gén. Bot. **51** u. **52** (1939/40). — DRAWERT, H.: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. 1. Mitteilung. Literaturübersicht und Versuche mit Oscillatoria Borneti Zukal. Planta (Berl.) **37**, 161 (1949/50). — EBEL, J. P.: Beteiligung der Metaphosphorsäure an der Zusammensetzung der Bakterien und tierischen Gewebe. C. r. **225**, 1312 (1949). — ELENKIN, A., et A. DANILOV: Recherches cytologiques sur les cristaux et les grains de sécrétion dans les cellules de Symploca muscorum (Ag.) Gom. et quelques autres Cyanophycées. Bull. d. Jardin Impér. Botan. d. Pierre le Grand, T. 16, 1. (1916). — FEULGEN, R.: Die Nuclealfärbung. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von E. ABDERHALDEN, Abt. V, Teil 2, H. 10. 1926. — FEULGEN u. H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Hoppe-Seylers Z. **135** (1924). — FISCHER, A.: Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bakterien. Jena 1897. — Die Zelle der Cyanophyceen. Bot. Ztg **1905**, H. 1/2. — FREY-WYSSLING, A.: Submicroscopic morphology of protoplasm und its derivatives. New York.

Amsterdam 1948. — GARDNER, N.: Cytological Studies in Cyanophyceae. Univ. of California Publ. Bot. **2**, Nr 12 (1906). — Nouvelles recherches sur la structure des Cyanophycées. Rev. gén. Bot. **38** (1926). — GEITLER, L.: Kleine Mitteilungen über Blaualgen. Österr. bot. Z. **70** (1921a). — Zur Cytologie der Blaualgen. Arch. Protistenkde **45** (1922). — Cyanophyceae. In RABENHORSTS Kryptogamenflora. Leipzig 1930/32. — Kleine Mitteilungen über neue oder wenig bekannte Blaualgen. Österr. bot. Z. **84** (1935). — Schizophyceen. In Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. VI. 1936. — GON ALVES DA CUNHA, A.: Sur la signification du corps central des Cyanophycées. C. R. Soc. Biol. Paris **118** (1935). — GUILLIERMOND, A.: Contribution à l'étude cytologique des Cyanophycées. Rev. gén. Bot. **18** (1906). — Nouvelles observations sur la structure des Cyanophycées. C. R. Acad. Sci. Paris **1925**. — A propos de la structure des Cyanophycées. C. R. Acad. Sci. Paris **1925**. — La structure des Cyanophycées. Rev. gén. Bot. **38** (1926). — Nouvelles recherches sur la structure des Cyanophycées. C. R. Acad. Sci. Paris **197** (1933). — HANSGIRG, A.: Über den Polymorphismus der Algen. Bot. Cbl. **22** (1885). — HAUPT, A.: Cell structure and cell division in the Cyanophyceae. Bot. Gaz. **75** (1923). — HEGLER, R.: Untersuchungen über die Organisation der Phykochromaceenzelle. Jb. Bot. **36** (1901). — HOLLANDE, A.: Remarques au sujet de la structure cytologique des Cyanophycées. C. R. Soc. Biol. Paris **109** (1932). — Remarques au sujet de la structure cytologique des Cyanophcées. Archives de Zool. **75** (1933). — HOLLANDE, A., u. G. HOLLANDE: La structure cytologique des cellules des Cyanophycées. Archives de Zool. **110** (1932). — IMSENICKI, A.: Die FEULGENsche Nuclealreaktion bei Bakterien und Hefen. Zbl. Bakter. II **94**, 330 (1936). — On the structure of anaerobic bacteria. J. Bacter. **49**, 1 (1945). — KNAYSI, G.: A morphological study of Streptococcus faecalis. J. Bacter. **42**, 575 (1941). — The demonstration of a nucleus in the cell of a staphyococcus. J. Bacter. **43**, 365 (1942). — Elements of bacterial cytology. Compst. Publishing Comp. (1944) (Ref.). — Further observations on the nuclear material of the bacterial cell. J. Bacter. **51**, 177 (1946). — Preliminary observations on germination of the spores of Bacillus mycoides in a nitrogen-free medium and certain properties of the transparent cells. J. Bacter. **55**, 753 (1948). — The endospore of Bacteria. Bacter. Rev. **12**, 19 (1948). — Cytology of Bacteria II. Bot. Rev. **15**, 106 (1949). — KNAYSI, G., and R. F. BAKER: Demonstration with the electron microscope of a nucleus in Bac. mycoides grown in a nitrogen-free medium. J. Bacter. **53**, 539 (1947). — KNASYI, G., and HILLIER: A study with the high-voltage electron microscope, of the endospore and life cycle of Bacillus mycoides. J. Bacter. **53**, 525 (1947). — KNAYSI, G., and STUART MUDD: The internal structure of certain Bacteria as revealed by the electron microscope — a contribution to the study of the bacterial nucleus. J. Bacter. **45**, 349 (1943). — KNÖLL, H.: Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Bakteriologie. Zeiß-Nachr. V. F. **1944**, 38. — KÖNIG, G., u. A. WINKLER: Über Einschlüsse in Bakterien und ihre Veränderung im Elektronenmikroskop. Naturwiss. **1948**, H. 5, 136. — KOHL: Über die Organisation und Physiologie der Cyanophyceenzelle und die mitotische Teilung ihres Kerns. Jena 1903. — KUCELA, J.: Zakonisoski zivota, S. 199. Prag 1930. Ref. Zbl. Bakter. I Orig. **102**, 133 (1931). — LETTR , H.: Neuere Ergebnisse der Chemie der Kern- und Zellteilung. Angew. Chem. **1949/50**, 196. — MACALLUM, A.: On the detection and localisation of phosphorus in animal and vegetable tissues. Proc. roy. Soc. Lond. **63** (1898). — On the cytology of non-nucleated organisms. Trans. Canad. Inst. **6** (1899). — Die Methoden der biologischen Mikrochemie. In Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden von E. ABDERHALDEN, Bd. V, Teil II. 1912. — MCILWAIN, H.: A nutritional investigation of the antibacterial action of Acrifiavine. Biochem.

J. **35**, 1311 (1942). — MALMGREN, B., u. C. G. HEDEN: Studies of the nucleotide metabolism of bacteria. I. Ultraviolet microspectography as an aid in the study of the nucleotide content of Bacteria. II. Aspects of the problem of the bacterial nucleus. Acta path. et microbiol. scand. (Københ.) **24**, 418 (1947). — MARX, F. A.: Untersuchungen über die Zellen der Oscillarien. Diss. Erlangen 1892. — MASSART, J.: Recherches sur les organismes inférieurs. V. Mém. Acad. Sci. Belg. **1901**. — MEYER, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg, Abt. I, **62** (1904). — MILOVIDOV, P.: Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den Mycobakterien und einigen anderen Bakterien. Arch. Mikrobiol. **6**, 475 (1935). — MINCK, R., u. A. MINCK:, Über den Aufbau des Diphtheriebacillus: Kernapparat und metachromatische Granulation. C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **228**, 1313 (1949). — MUDD, ST., u. A. G. SMITH: Elektronen- und lichtmikroskopische Kernstudien an Bakterien. Referat, gehalten auf der II. Tagung der Gesellschaft für Elektronenmikroskopie zu Bad Soden 1950. — MÜLLER, REINER: Virus, Bacterium, Chlorophyllkorn und Zelle. Forschgn u. Fortschr. **1947**, 186. — NADSON, G.: Über den Bau des Cyanophyceen-Protoplastes. St. Petersbourg 1895. — NOLTE: Untersuchungen über basophile Plasmastrukturen. Z. Naturforschg **2b** (1947). — NORD-WEIDENHAGEN: Handbuch der Enzymologie. 1940. — OLIVE, E.: Mitotic division of the nuclei of the Cyanophyceae. Beih. z. Bot. Zbl. **18**, I. Abt. (1905). — PESHKOFF, M. A.: Phylogenesis of new microbes. Caryophanon latum and Caryophanon tenue, organisms which are intermediate between blue-green Algae and the Bacteria. J. gen. Biol. (Russ.) **1**, 598 (1940). — Fine structure and mechanism of division of the „Nuclei" of the bacterium Caryophanon latum. Nature (Lond.) **157**, 137 (1946). — PHILLIPS, O.: A comparative study of the cytology and movements of the Cyanophyceae. Contrib. Bot. Lab. Univ. Pennsylvania. **1094** — PIEKARSKI, G.: Cytologische Untersuchungen an Paratyphus- und Colibakterien. Arch. Mikrobiol. **8**, 428 (1937). — Endomitose beim Großkern der Ciliaten? Versuch einer Synthese. Biol. Zbl. **61**, 416 (1941). — Zum Problem des Bakterienzellkerns. Erg. Hyg. **26** (1949). — PIETSCHMANN, K.: Die Zellkernfrage bei den Bakterien. Arch. Mikrobiol. **2**, 310 (1931). — PIETSCHMANN, K., u. A. RIPPEL: Zur Zellkernfrage bei den Bakterien, Untersuchungen mit Hilfe der FEULGENschen Nuclealreaktion. Arch. Mikrobiol. **3**, 422 (1932). — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHEVSKY: Zur Frage über die Struktur der Cyanophyceen-Zelle. Archiv Protistenkde **67** (1929). — POKROWSKAJA, M.: Cytologische Beobachtungen über den Dissoziationsprozeß der Pestbacillen. Zbl. Bakter. I Orig. **119**, 353 (1931). — POLLISTER, A. W. u. C. LEUCHTENBERGER: The nature of the specifity of methylgreen for chromatin. Zoology **35**, 111 (1949). — PRAT, S.: K mikrochemii volutinovych zrn Cyanophycei. Rozpravi české Akademie vèd. a umèni. Trida II R 28. (1919). — Plasmolyse des Cyanophycées. Bull. int. Acad. Sci. Bohême. Prag **1921**. — Beitrag zur Kenntnis der Organisation der Cyanophyceen. Arch. Protistenkde **52** (1925). — PRINGSHEIM, E. G., and C. ROBINOW: Observations on two very large Bacteria, Caryophanon latum Peshkoff and Lineola longa (nomen provisorium). J. gen. Microbiol. **1**, 267 (1947). — REICHENOW, E.: Ergebnisse mit der Nuclealfärbung bei Protozoen. Arch. Protistenkde **61** (1928). — ROBINOW, C. F.: A study of the nuclear apparatus of Bacteria. Proc. roy. Soc. Biol. Lond. **130**, 229 (1942). — Cytological observations on Bact. coli, Proteus vulgaris and various aerobic spore-forming Bacteria with special reference to the nuclear structures. J. of Hyg. Cambridge **43**, 413 (1944). — Addendum. In DUBOS, The bacterial cell. Harvard-Univ. Press Cambridge (Mass.) 1947. — SCHAARSCHMIDT, J.: Zur Morphologie des Chlorophylls und des pflanzlichen Zellkerns. Klausenburg 1881. — SCHAEDE, R.: Zum Problem des Vorkommens von chromatischer Substanz bei Bakterien und Actinomyceten. Arch. Mikrobiol.

10, 473 (1939). — SCHUCKMANN, W. v., u. G. PIEKARSKI: Beiträge zum Problem der Dauermodifikation bei Protozoen. Arch. Protistenkde **93**, 355 (1940). — SCOTT, D.: On nuclei in Oscillaria and Tolypothrix. J. Linn. Soc. Bot. **24** (1887). — STILLE, B.: Cytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der FEULGENschen Nuclealreaktion. Arch. Mikrobiol. 8, 125 (1937). — TULASNE, R., et R. MINCK: Mise en évidence des noyaux des Cocci par la ribonucléase. C. R. Soc. Biol. Paris **141**, 1255 (1947). — VENDRELY: Les deux acides nucléiques bactériens et leur signification. Congr. Chim. Biol. Liège **1946**. — VIAME, J. M.: Das Vorkommen und physiologische Verhalten von zwei Metaphosphatfraktionen in der Hefe. J. of biol. Chem. **178** (1949). — VOIT, K.: Über das Verhalten der Bakterien zur Nuclealfärbung. Z. exper. Med. **47**, 183 (1925). — Über das Verhalten der Bakterien zur Nuclealfärbung. Z. exper. Med. **55**, 564 (1927). — WAGER, H.: The cell structure of the Cyanophyceae. Proc. roy. Soc. Lond. **72** (1903). — WILLE, N.: Über die Zellkerne und Poren der Wände bei Phykochromaceen. Ber. dtsch. bot. Ges. **1** (1883). — WINKLER, A., u. H. KÖNIG: Zur Deutung elektronenoptischer Befunde an Bakterien. Zbl. Bakt. I Orig. **152**, 9 (1948). — ZACHARIAS, E.: Über die Zellen der Cyanophyceen. Bot. Ztg **48** (1890). — Über die Zellen der Cyanophyceen. Bot. Ztg **50** (1892). — Über die Zellen der Cyanophyceen. Bot. Ztg **51** (1893). — Über die Zellen der Cyanophyceen. Jb. wiss. Anst. Hamburg **1903**. — Über die neuere Cyanophyceenliteratur. Bot. Ztg **65** (1907).

Herrn Prof. Dr. med. HELMUT RUSKA danke ich in besonders herzlicher Weise dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, vorliegende Arbeit in seinem Institut durchführen zu können, und mit großem Interesse den Fortgang der Arbeit begleitet hat.

Dr. G. BRINGMANN, Berlin-Dahlem, Faradayweg 16.

Planta, Bd. 38, S. 564—585 (1950).

Aus dem Botanischen Institut der Universität München.

VERSUCHE ZUR KULTUR ISOLIERTEN PFLANZENGEWEBES IN VITRO.

Von

OTTO KANDLER.

Mit 9 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Juli 1950.)

A. Einleitung.

Die Regenerationsfähigkeit der Pflanzen war bereits im vorigen Jahrhundert Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dabei sollten die Möglichkeiten, die der pflanzliche Organismus zur Wiederherstellung seiner ursprünglichen Gestalt besitzt, ermittelt werden. Mit seinen „Untersuchungen über die Grenzen der Teilbarkeit der Pflanzen" erreichte RECHINGER (1893) einen Punkt, von dem aus nur ein kleiner Schritt hinüberführt zu der Frage nach den Entwicklungsmöglichkeiten, die jede einzelne Pflanzenzelle in sich birgt und die nur manifest zu werden vermögen, wenn die Zelle von den korrelativen Einflüssen des übrigen Pflanzenkörpers befreit wird.

Diese Forderung nach der Kultur der Pflanzenzelle schlechthin formulierte ein Jahrzehnt später erstmalig HABERLANDT (1902). Er versuchte auch eine experimentelle Lösung dieses Problems und begann mit Kulturversuchen an Mesophyllzellen von *Lamium purpureum*, Staubfadenhaaren von *Tradescantia* und anderen Objekten. Alle diese Arbeiten führten ebensowenig zum Erfolg wie zahlreiche in den folgenden Jahren ausgeführte Versuche anderer Autoren. In einem Sammelreferat von FIEDLER (1939) sind diese Bemühungen zusammengefaßt.

Einen ersten wesentlichen Erfolg erzielten KOTTE (1922) und ROBBINS (1922), denen es gelang, auf einem synthetischen Nährboden Wurzelspitzen von 5 mm Länge zur Weiterentwicklung zu bringen. Damit war die pflanzliche Organkultur begründet, und in der Folgezeit wurde sie rasch weiter ausgebaut. Ein Hauptziel war dabei das Erreichen unbegrenzt wachsender Dauerkulturen, die WHITE (1934) mit Tomatenwurzeln und 3 Jahre später BONNER und ADDICOTT (1937) mit Erbsenwurzeln verwirklichten. Nachdem in den letzten Jahren die ursprünglich bei Dauerkulturen erforderlichen Hefeextrakte durch definierte Stoffe (Vitamin B_1, Aminosäuren, Spurenelemente) ersetzt werden konnten, ist die Kultur isolierter Wurzeln zu einer gut fundierten Methode geworden, die bereits in den Dienst spezieller physiologischer Fragestellungen gestellt werden kann.

Dagegen blieb das Ziel, Gewebekulturen im engeren Sinne, so wie sie mit tierischen Objekten von CARREL und HARRISON verwirklicht wurden, zu erhalten, noch lange Zeit unerreicht. Gewisse Fortschritte in dieser Richtung hatte nur GAUTHERET (1937/38) bei Versuchen mit Kambiumgewebe verschiedener Holzgewächse zu verzeichnen. Beinahe gleichzeitig folgten aber an der Jahreswende 1938/39 die Erfolgsmeldungen aufeinander. In USA. gelang WHITE (1939) die Kultur von Kallusgewebe eines Tabakbastardes, und aus Frankreich berichteten wenige Wochen später GAUTHERET (1939) und NOBÉCOURT (1939) unabhängig voneinander die erfolgreiche Kultur von Karottengewebe. Anschließend an diese Arbeiten entwickelten sich in den folgenden Jahren 2 verschiedene Forschungsrichtungen. In den USA. stand das Tumorproblem im Mittelpunkt des Interesses und diese Arbeiten erhielten ihre besondere Bedeutung, seit es WHITE und BRAUN (1941) gelang, bakterienfreies Tumorgewebe aus Sekundärtumoren in Kultur zu nehmen. Zusammenfassend berichtete in neuerer Zeit STAPP (1947) über diese Fortschritte.

Die französischen Forscher wandten sich mehr entwicklungsphysiologischen Fragestellungen zu und verwendeten ausschließlich normales Gewebe, vorwiegend von Holzgewächsen und Karotten. Zahlreiche Arbeiten gelten der Beschreibung verschiedener Differenzierungserscheinungen und den Polaritätsphänomenen. Sie sind in Sammelreferaten von WHITE (1946), GAUTHERET (1947) und KANDLER (1948) zusammengefaßt.

Bei Beginn vorliegender Arbeit im Sommer 1947 lag nur ein Bruchteil der neueren ausländischen Literatur vor, während deutsche Arbeiten auf diesem Gebiete in den letzten 12 Jahren vollständig fehlen. Gleichzeitig mit der Verarbeitung der allmählich eintreffenden Literatur wurde mit der experimentellen Arbeit begonnen, um den Anschluß an die Fortschritte des letzten Jahrzehnts zu gewinnen und eigene Beobachtungen zu diesem Problem beitragen zu können. Da bakterienfreie Sekundärtumore noch nicht zur Verfügung standen, wurde zunächst mit normalem Gewebe gearbeitet. Die von GAUTHERET verwendeten Zusätze von reinen Aminosäuren und Vitaminen standen infolge der schwierigen Nachkriegsumstände nicht zur Verfügung, und es mußte versucht werden, mit einfacheren Mitteln zum Erfolg zu kommen. Als Ersatz dienten Hefeextrakte und Pepton. Erstere erwiesen sich allerdings bald als ungünstig und kamen nicht mehr zur Verwendung.

B. Allgemeine Methodik.

Eine eingehende Besprechung der allgemein für Gewebkulturen verwendeten Geräte und Arbeitsweisen unter Berücksichtigung der

gesamten älteren Literatur gibt WHITE (1943), so daß hier nur eine kurze Darstellung der speziell in dieser Arbeit benützten Methodik gegeben werden soll.

1. Glaswaren.

Als Kulturgefäße dienten durchwegs normale Reagensgläser, die mit Wattepfropfen oder Kapsenbergkappen verschlossen wurden. Eine besondere Berücksichtigung der Glassorten war den Zeitumständen entsprechend nicht möglich. Die Reinigung erfolgte durch 24stündiges Einlegen in Bichromatschwefelsäure und anschließendes gründliches Auswaschen mit Seifenlösung und Aqua dest.

2. Nährlösungen.

Nach einigen orientierenden Versuchen, bei denen mehrere der in der Literatur zahlreich angegebenen Nährlösungen verwendet wurden, kam ausschließlich die von WHITE (1943) angegebene zur Verwendung; allerdings mit kleinen Abänderungen.

1000 cm³ Aqua bidest.	65 mg KCl
360 mg $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	16 mg $KH_2PO_4 \cdot H_2O$
200 mg $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$	Spur $Fe_2(SO_4)_3$
200 mg Na_2SO_4	1 cm³ HOAGLANDsche A—Z-Lösung
80 mg KNO_3	10 g Agar, 20 g Glukose

Da laufend größere Mengen von Nährlösung gebraucht wurden und um die Fehlergrenze beim Abwiegen der Chemikalien möglichst gering zu halten, wurden von den mineralischen Bestandteilen der Nährlösung Stammlösungen der zehnfachen Konzentration hergestellt. Zur Vermeidung von Ausfällungen von $CaSO_4$ und anderer schwerlöslicher Verbindungen, die bei den starken Konzentrationen in den Stammlösungen auftreten könnten, wurden 2 getrennte Stammlösungen bereitet. Davon enthielt die eine $MgSO_4$ und Na_2SO_4, die andere die übrigen Salze. Der Zusatz von Eisen erfolgte erst bei der Herstellung der endgültigen Nährlösung.

Der Agar wurde vor seiner Verwendung 8 Tage in fließendem Wasser ausgewaschen und wiederholt mit Aqua dest. nachgespült. Die in dieser Arbeit erwähnten Zusätze von Vitamin B_1, Heteroauxin und Pepton wurden stets nach dem Sterilisieren der Nährböden zugegeben, nachdem die entsprechend konzentrierten Lösungen durch Filtration mittels eines Membranfilters (Fabrikat der Membranfiltergesellschaft Göttingen) keimfrei gemacht worden waren. Dadurch wurde eine Inaktivierung der thermolabilen Stoffe verhindert.

3. Sterilisationsmethoden.

Alle Nährböden wurden nach Abfüllen in die Kulturgefäße an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 45 min im Dampftopf bei Atmo-

sphärendruck sterilisiert. Die Sterilisation der bei der Präparation des Gewebes benötigten Glaswaren und Geräte erfolgte im Trockenschrank bei 140° C.

Um aus Stengel- oder Rhizomstücken sterile Gewebeteile entnehmen zu können, wurde der Stengel abgebrochen und mit einer sterilen Pinzette von der Bruchstelle ausgehend die Epidermis abgezogen. Das so gewonnene sterile Stück wurde nun unter einer sterilen, umgekippten Petrischale auf eine sterile Glasplatte gelegt und konnte nun, während die Petrischale mit der linken Hand leicht angehoben wurde, ohne große Infektionsgefahr mit der Lanzettnadel in die gewünschten kleinen Teile zerlegt werden. Diese wurden dann mit einer Impfnadel auf die schräg erstarrten Agarnährböden übertragen.

Trotz größter Vorsicht erwiesen sich zahlreiche auf diese Art angelegte Kulturen als infiziert. Teilweise konnten alte Stichstellen pflanzensaftsaugender Insekten als Ausgangspunkte der Infektion erkannt werden, aber vielfach beruhte die Infektion auf der nicht ganz einwandfreien Entfernung der Epidermis. Häufig kommt es vor, daß man mit Epidermisfetzen die bereits frei gelegten Teile berührt, ohne dies immer sogleich zu bemerken. Es erwies sich daher als rationell, die Gewebeteile nicht gleich zu mehreren auf die endgültigen Nährböden zu übertragen, sondern sie vorher einzeln auf ihre Sterilität zu prüfen, wozu wie folgt verfahren wurde: In eine Petrischale wurden auf mit Sublimatlösung getränktes Filtrierpapier 2 mit Wachsfüßchen versehene Objektträger gelegt und auf diese je 2 Reihen Tropfen einer Nährlösung unter sterilen Kautelen gesetzt. Auf jeden Tropfen wurde dann ein Gewebestück gesetzt und bei nachfolgender Bebrütung im Thermostaten waren die Verunreinigungen schon nach wenigen Tagen makroskopisch gut sichtbar, blieben aber zunächst auf den jeweiligen Tropfen beschränkt, so daß die sterilen Nachbarstücke ohne Gefahr entnommen und auf den endgültigen Nährboden übertragen werden konnten.

Da die verwendeten Nährböden einen für Bakterien ungünstigen p_H-Wert besaßen wäre es denkbar, daß sich an den Geweben eine schwache Bakterienflora entwickeln könnte, die aber wegen der ungünstigen Bedingungen nicht zur Weiterentwicklung gelangt und damit makroskopisch nicht sichtbar wird. Um dies zu prüfen wurden in wiederholten Versuchen Gewebeteile nach verschieden langer Kulturdauer auf optimale Bakteriennährböden (Fleischwasser-Pepton-Agar oder Bierwürze-Agar) ausgelegt und bebrütet. In keinem Falle konnte eine Bakterienentwicklung festgestellt werden. Auch eine Überführung der Gewebe in stark alkalische Nährlösungen, in denen sich nach SCHANDERL (1947) besonders häufig Bakterien aus Geweben entwickeln sollen, hatte stets negative Ergebnisse. Es kann daher angenommen werden, daß es sich in vorliegender Arbeit wirklich um sterile Kulturen handelte.

4. Einstellen des p_H-Wertes.

Nach übereinstimmenden Mitteilungen in der Literatur liegt der optimale p_H-Bereich für Gewebekulturen zwischen $p_H = 5{,}5$ und 6,5. Kleine Schwankungen innerhalb dieses Bereiches sind nicht von beobachtbarer Wirkung. Es genügten daher relativ grobe Methoden zur Kontrolle des p_H-Wertes. Durchwegs wurde nach dem Verflüssigen des Agars und vor dessen Abfüllung in die Kulturgefäße der p_H-Wert mit dem Merck-Universalindikator bestimmt. Gewöhnlich lag der p_H-Wert bereits bei 6,0 und nur selten waren Korrekturen mit HCl oder Na-Bicarbonat nötig. Eine wesentliche Veränderung bei der folgenden Sterilisation ergab sich, wie Kontrollen zeigten, nicht mehr.

C. Versuchsergebnisse.

1. Versuche mit Stengelgewebe von Helianthus annuus.

Als erstes Objekt wurde *Helianthus annuus* gewählt, von dem GAUTHERET (1947) berichtet, daß es zwar in Kultur genommen wurde, aber bisher keine sicher wachsenden Dauerkulturen lieferte. Die in den USA. in zahlreichen Arbeiten verwendeten Stämme von Sonnenblumengewebe entstammen alle bakterienfreien Sekundärtumoren (ROPP 1946, HILDEBRANDT 1945, RICKER 1948) und nicht normalem Stengelgewebe.

Zunächst kamen, auf Grund der allgemeinen Ansicht, daß sich junges, noch nicht ausdifferenziertes Gewebe besonders gut für Gewebekulturen eignen müsse, Gewebeteile aus jungen Sonnenblumensämlingen zur Verwendung. Nach der Entfaltung des ersten Blattpaares wurde das erste Internodium abgebrochen und nach der beschriebenen Methode kleine, etwa 3 mm im Durchmesser messende Stücke entnommen und auf einen Nährboden übertragen. Während die Kontrollreihen nur die angegebene Grundnährlösung enthielten, bekamen andere Reihen zusätzlich 0,01 mg—10,0 mg β-Indolylessigsäure (IES) und 1,0 mg—100,0 mg Pepton Witte pro Liter. In den meisten Fällen verloren die Gewebe in den nächsten Tagen ihre grüne Farbe und starben ab. Nur sehr wenige zeigten nach 14 Tagen kallöse Wucherungen und konnten zerteilt und auf neues Substrat übertragen werden. Dabei zeigte sich kein Einfluß der verschiedenen Zusätze. Die wenigen wachsenden Gewebeteile verteilten sich gleichmäßig auf die verschiedenen Reihen.

Als in weiteren Versuchen auch ältere Stengelteile verwendet wurden, ergab sich eine wesentlich bessere Ausbeute an gut wachsenden Kulturen. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Kontrollreihen (ohne organische Zusätze) zahlenmäßig zusammengestellt. Die aus jungen Pflanzen entnommenen Gewebeteile enthielten alle am Aufbau des Stengels beteiligten Zellelemente, da in diesen Fällen ganze, 2—3 mm dicke Stengelquerschnitte in 4 Sektoren geteilt wurden. Bei Verwendung alter, dicker

Tabelle 1. *Abhängigkeit der Kallusbildung vom Alter des Ausgangsgewebes.*

Ausgangsmaterial	Anzahl der isolierten Stücke	Anzahl der Stücke mit Kallusbildung	Ausbeute in %
Junge Pflanze. 1. Internodium	80	5	6,2
Junge Pflanze. 2. Internodium	80	15	18,7
Junge Pflanze. 3. Internodium	60	15	25,0
Alte Pflanze mit Knospe	100	60	60,0
Alte Pflanze mit Blüte	100	50	50,0

Stengel dagegen kam nur das äußere Parenchym mit Teilen der Leitbündel zur Verwendung, während das Mark verworfen wurde.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, eignet sich älteres Gewebe offensichtlich besser als Ausgangsmaterial für Gewebekulturen als ganz junges. Dies erscheint zunächst als ein Paradoxon, da man mit zunehmender Differenzierung häufig eine Abnahme der potentiellen Fähigkeiten einer Zelle annehmen möchte, wie dies in der Archiplasmatheorie Miehes (1929) besonders deutlich zum Ausdruck gebracht wird. Die hier mitgeteilten Befunde erinnern auch an eine alte Erfahrung aus der gärtnerischen Praxis, wonach zur Stecklingsvermehrung die jüngsten Sproßenden völlig ungeeignet sind und nur sehr selten anwachsen. Die Sprosse müssen erst eine gewisse Festigkeit, fast möchte man sagen „Reife", besitzen, bevor sie verwendet werden können.

Vielleicht lassen sich diese Beobachtungen mit neueren Vorstellungen in Zusammenhang bringen, die Bünning (1948) im Anschluß an entwicklungsgeschichtliche Studien entworfen hat. Danach steht am Anfang jeder Neubildung (Wurzelhaar, Spaltöffnung, Saugschuppe usw.) eine inäquale (differentielle) Teilung, die ihrerseits wieder am Ende einer längeren Reihe äqualer Teilungen steht. Eine kambiale Zelle wäre demnach zunächst nur zu einer Reihe von normalen Teilungen befähigt, in deren Verlauf das Teilungshormon aufgebraucht wird und durch Anhäufung von Stoffwechselprodukten die Teilungsfähigkeit erlischt. In diesem vorläufigen Endzustand können aus noch unbekannten Gründen inäquale Teilungen auftreten, als deren Ergebnis eine plasmareiche und eine plasmaarme Zelle entstehen. Erstere ist zu erneuter Zellteilung befähigt und liefert unter den korrelativen Einflüssen des übrigen Pflanzenkörpers ortsgemäße, sinnvolle Organe, während in der Gewebekultur daraus unorganisierte Kallusbildungen entstehen können.

Unabhängig von diesen Überlegungen kommt Zuppinger (1947) bei der Analyse der Tumorgenese im tierischen Organismus zu ganz ähnlichen Folgerungen. Gerade wenn man den Zeitpunkt der Tumorentstehung in den Mittelpunkt der Betrachtungen stellt, ergibt sich, daß nicht die erste Zelle einer Entwicklungsreihe Ausgangspunkt eines Tumors wird, sondern die letzte. Die am Ende ihrer normalen Teilungs-

fähigkeit angelangte Zelle vermag durch irgendwelche Faktoren zu erneuter Entwicklung angeregt zu werden und bildet damit die Grundlage für pathologische Neubildungen.

Bei isoliertem Pflanzengewebe stellen wohl Wundreiz und veränderte Außenbedingungen, die mit der Isolierung verbunden sind, die äußere Ursache der erneuten Teilungsfähigkeit dar. Während junges, noch in Entwicklung begriffenes Gewebe auf Grund seiner im ursprünglichen Pflanzenkörper erfolgten Determinierung nur zur Produktion gleichartigen Gewebes befähigt ist und den veränderten Umweltbedingungen nach der Isolierung erliegt, vermag älteres, widerstandsfähiges Gewebe durch das Auftreten inäqualer Teilungen und der damit eingeleiteten Neuentwicklung das dem neuen Substrat adäquate Gewebe zu bilden. Diese vorläufig noch hypothetischen Überlegungen bedürfen allerdings noch der Bestätigung durch eingehende entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen, die bisher noch nicht ausgeführt werden konnten.

Die nach 14 Tagen auf das Doppelte der ursprünglichen Größe herangewachsenen Gewebeteile wurden in je 2 Teile zerschnitten und auf neues Substrat übertragen. Das weitere Wachstum zeigte nun eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen an IES und Pepton. Da Versuche dieser Art, wenn auch mit anderen Objekten, bereits von anderen Autoren (GAUTHERET 1940, WHITE 1943) eingehend beschrieben wurden, sollen sie hier nicht näher dargestellt werden: Von den verfügbaren Mitteln erwies sich ein Zusatz von 10^{-6} IES und 10^{-5} Pepton Witte als optimal, und bei allen künftig beschriebenen Versuchen kamen diese Zusätze zur Anwendung. Im folgenden soll der typische Entwicklungsverlauf von Gewebekulturen aus Sonnenblumenstengeln, wie er während einer Kulturdauer von 10 Monaten beobachtet werden konnte, dargestellt werden.

In den ersten Wochen erfolgte die Bildung eines vollkommen parenchymatischen Gewebes, dessen Entwicklung von der Umgebung der Leitbündel ausging. Die Neubildungen waren hellgrün und locker, in den jüngsten Teilen durchscheinend. Differenzierungen waren nicht zu beobachten. Abb. 1 zeigt ein typisches Bild dieses Entwicklungszustandes. Im Laufe von 2—3 Passagen (die Übertragungen erfolgten in 14tägigem Abstand) verschwand die hellgrüne Farbe allmählich, obwohl die Kulturen dem diffusen Tageslicht ausgesetzt waren, und das Gewebe nahm eine gelbliche Färbung an, die später in dunkles Braun überging. Mit zunehmendem Alter traten regellos verstreute Tracheidengruppen in den Neubildungen auf, die häufig sehr stark verholzten, so daß es manchmal Schwierigkeiten bereitete, das Stück zu zerteilen. Der Neuzuwachs verlangsamte sich und das neue Gewebe war nicht mehr wie anfangs grün und locker, sondern rein weiß und sehr dicht. Schon

auf wenige parenchymatische Zellagen an der Oberfläche des Kallus folgten verholzte Partien.

Von der zweiten Passage an trat auch starke Wurzelbildung auf. Dabei konnte allerdings keine Bevorzugung der ursprünglichen Unter- oder Oberseite des Stengelstückes festgestellt werden, während GAUTHERET (1940) bei Karottengewebe deutliche Polaritätsphänomene beschrieb. Dagegen war es stets so, daß die dem Substrat anliegende Fläche des Gewebes wurzelfrei blieb. Dies mag mit der an dieser Stelle stark gehemmten Sauerstoffzufuhr zusammenhängen. Die Wurzeln erreichten gewöhnlich eine Höchstlänge von 1,5 cm und gingen dann, häufig auch schon früher, zu desorganisiertem Wachstum über. Unter Vergrößerung und Vermehrung der Rindenparenchymzellen schwollen einzelne Teile, manchmal auch die ganze Länge der Wurzel, stark an und wuchsen nach Abtrennung vom Ausgangsgewebe und Übertragung auf neues Substrat als unorganisierte Kallusgewebe weiter. Abb. 2 zeigt eine Reihe von Kulturen mit Wurzelbildung. Die Wurzeln zeigen verschiedene Stadien des beginnenden desorganisierten Wachstums. Die hellen Gewebepartien stellen die rasch wachsenden Teile dar, während die älteren Gewebestücke wegen ihrer braunen Farbe fast schwarz erscheinen.

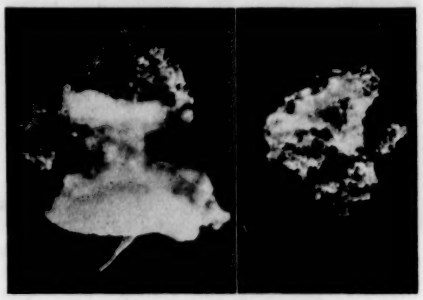

Abb. 1. Stengelgewebe von *Helianthus annuus* nach 14tägiger Kulturdauer.

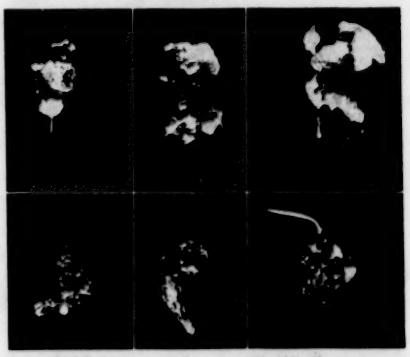

Abb. 2. Stengelgewebe von *Helianthus annuus* nach 12wöchiger Kulturdauer.

Sehr häufig entstanden die erwähnten Wucherungen an den Spitzen der Wurzeln. Es erweckte dann den Anschein, als gingen sie zur „Brutkörperbildung" über, da die abgetrennten Verdickungen erneut heranwuchsen und die gleiche Erscheinung sich wiederholte. Abb. 3 stellt einen derartigen „Entwicklungszyklus" dar. Die Entstehungsweise einer derartigen terminalen Wucherung ist aus einem Längsschnitt, wie ihn Abb. 4 zeigt, ersichtlich. Das normale Längenwachstum der Wurzel wird offensichtlich einseitig gehemmt und die Spitze rollt sich ein. Das

Rindenparenchym der jüngeren Wurzelteile geht dann zu starker, ungeordneter Vermehrung über, und es entsteht eine kallöse Wucherung, die sich auch über ältere Teile der Wurzel und die Nebenwurzeln schiebt, ohne aber zunächst damit in Fusion zu treten. Auf der Abb. 4 ist dieser Sachverhalt gut erkennbar. Während in den Spitzenpartien der Wurzel ein kontinuierlicher Übergang des Rindenparenchyms in die Wucherung besteht, grenzen sich die rückwärtigen Teile deutlich von dieser ab.

Abb. 3. Ganz links: Frisch isolierte terminale Wurzelwucherung von Sonnenblumengewebe. Daneben entsprechende Stücke nach 2 bzw. 4wöchiger Kulturdauer. Rechts: 10 Wochen altes Stück mit erneuter Wurzelbildung und terminalen Wurzelwucherungen.

Neben der Wurzelbildung traten als weitere Differenzierungserscheinungen auch Leitelemente in den isolierten Geweben auf. Sie bildeten aber keine normal organisierten Leitbahnen, sondern lagen desorganisiert im ganzen Gewebe verstreut. Bei den direkt aus Stengelgewebe hervorgehenden Kulturen waren die verholzenden Tracheiden sehr zahlreich. Dagegen blieben bei den aus Wurzelwucherungen hervorgehenden Stämmen die Tracheiden auf wenige Inseln beschränkt. Abbildung 5 zeigt einen Querschnitt durch ein derartiges Gewebestück, in dem es bereits zur Ausbildung von Tracheiden kam. Der Abschnitt rechts stellt die ursprüngliche Ausgangswurzel dar, von der noch der Zentralzylinder deutlich sichtbar ist. Die geraden Begrenzungslinien nach rechts und oben stammen von den bei der letzten Passage geführten Trennungsschnitten her. In dem lockeren, homogenen Kallusgewebe links heben sich die mit Phloroglucin-Salzsäure angefärbten verholzten

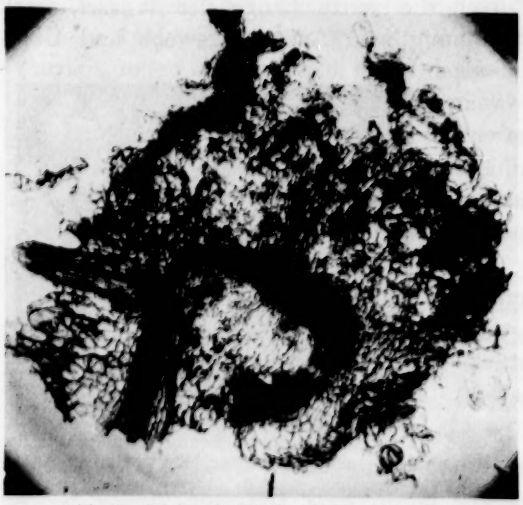

Abb. 4. Längsschnitt durch eine terminale Wurzelwucherung.

Tracheideninseln deutlich ab. Der in Abb. 6 wiedergegebene, vergrößerte Ausschnitt aus Abb. 5 zeigt die unregelmäßige Lage der Tracheiden, die netzförmige Wandverdickungen aufweisen. Die ringförmige Anordnung kleinerer Zellen in der Umgebung der Tracheideninsel kann man vielleicht als Andeutung eines Leptoms auffassen.

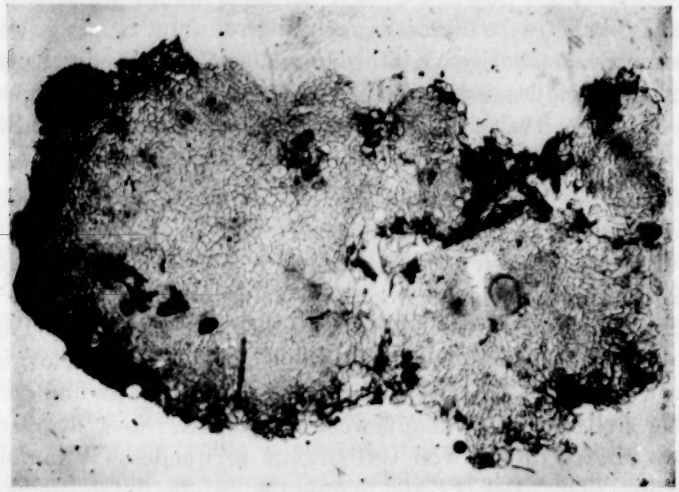

Abb. 5. Querschnitt durch ein aus einer Wurzelwucherung hervorgegangenes Gewebestück nach 8wöchiger Kulturdauer (angefärbt mit Phloroglucin-Salzsäure).

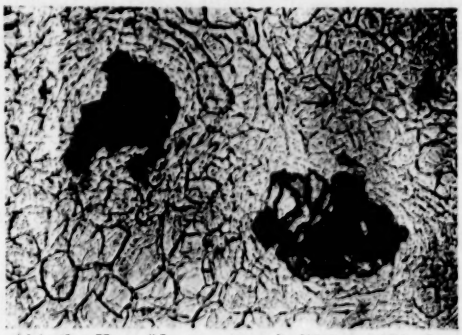

Abb. 6. Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 5.

Neben der Vermehrung der Gewebekulturen durch die beschriebene Abtrennung der Wurzelwucherungen erfolgte auch von Zeit zu Zeit eine Zerteilung des Grundgewebes, das dann im Verlauf von 2—3 Passagen (jeweils 14 Tage) auf die Ausgangsgröße heranwuchs. Die Geschwindigkeit des Zuwachses war bei den einzelnen Stämmen sehr unterschiedlich und dazu von der Jahreszeit abhängig. Allgemein scheint die Wachstumsgeschwindigkeit geringer zu sein als bei den von WHITE (1939) beschriebenen Tumorkulturen, die er bei jeder Passage unterteilen konnte. Die ältesten der hier beschriebenen Stämme befinden sich

seit 30. 6. 48 in Kultur und wurden bis zum Abschluß dieser Arbeit im März 1949[1] bei insgesamt 16 Passagen 8—10mal in jeweils 2—4 Stücke zerteilt. Bei Weiterführung sämtlicher Unterkulturen ergäbe dies eine Anzahl von größenordnungsmäßig 3^9, das sind rund 20000 Einzelkulturen. Außerdem wurden im gleichen Zeitraum noch zahlreiche Wurzelwucherungen abgetrennt und als selbständige Stämme weitergeführt. In Anbetracht dieser Vermehrungsrate und der Tatsache, daß nach nunmehr 8monatiger Kulturdauer die Wachstumsintensität nur sehr gering abgefallen ist, erscheint es als sicher, daß der verwendete Nährboden eine zeitlich unbegrenzte Kultur normalen, isolierten Stengelgewebes von *Helianthus annuus* gestattet.

Versuche, die Kulturen auch nach Weglassen einer der beiden Zusätze weiterzuführen, schlugen vorläufig fehl. Beim Fehlen von IES gingen die Gewebe schon nach 2 Passagen (4 Wochen) langsam zugrunde und zeigten von vorneherein nur mehr sehr geringen Zuwachs. Ohne Peptonzusatz ging ein vermindertes Wachstum noch mehrere Passagen weiter, hörte aber nach 2—3 Monaten endgültig auf. Die günstige Wirkung von Pepton haben in jüngster Zeit auch Ricker und Gutsche (1948) bei Kulturen von Tumorgewebe festgestellt. Es stellt offensichtlich einen Ersatz für die von Gautheret verwendeten Vitamine und Aminosäuren dar. Der Ersatz definierter Stoffe durch undefinierte Gemische, wie sie das Pepton darstellt, bedeutet für ernährungsphysiologische Betrachtungen natürlich einen Rückschritt. Wie bereits erwähnt, kam es aber in dieser Arbeit darauf an, unter den gegebenen Umständen überhaupt Dauerkulturen zu realisieren und den Entwicklungsablauf zu beschreiben. Dieses Ziel ist damit mit einem Gewebe erreicht worden, das bisher nicht in zuverlässiger Dauerkultur gehalten werden konnte.

Hat man als Ideal der Gewebekultur die Erzeugung eines gänzlich undifferenzierten Gewebes, des pflanzlichen Gewebes schlechthin, im Auge, so stören sowohl bei den hier, als auch bei von anderen Autoren beschriebenen Kulturen das Auftreten von Wurzeln und die Anlage von Leitelementen. Um eine Verminderung der Wurzelbildung zu erreichen, wurden zunächst geringere IES-Konzentrationen verwendet, da die IES bekanntlich die Wurzelbildung stark fördert. In diesen Fällen ging aber gleichzeitig das Wachstum stark zurück, und es erschien nicht möglich, eine Konzentration zu ermitteln, die das Kalluswachstum aufrecht erhielt, ohne daß Wurzeln und Tracheiden angelegt wurden.

[1] Seit Abschluß dieser Arbeit bis zu ihrer Drucklegung im Sommer 1950 wurden die Kulturen weitergeführt. Wenn auch die Wachstumsintensität gegenüber den ersten Monaten der Kultur etwas nachgelassen hat, weisen sie auch jetzt, nach annähernd 2 Jahren, noch Kallus- und Wurzelbildung auf.

Eine andere Möglichkeit, undifferenziertes Gewebe zu erhalten, bestand darin, daß die Gewebeteile durch häufigere Teilungen sehr klein gehalten wurden. Erfahrungsgemäß treten die Differenzierungen erst im Laufe der Zeit ein, während zunächst ein weitgehend homogenes Gewebe entsteht. Durch rasch aufeinanderfolgende Teilungen müßte diese Entwicklung hintan gehalten werden können; ein Verfahren, das an die Methode erinnert, mit der HARTMANN (1947) die „Unsterblichkeit" von Hydrozoen und Infusorien erzwang. In diesen Fällen wurden die Organismen durch schlechte Ernährung und wiederholte Verstümmelung an der Sprossung und der Einleitung der reproduktiven Phase gehindert und damit eine starke Verlängerung der Lebensdauer erreicht.

In unserem Falle wurden kleine Teilchen von maximal 2 mm Durchmesser von älteren Gewebekulturen isoliert und auf einen frischen Nährboden übertragen. Sie zeigten ein vollständig unorganisiertes Wachstum, bis sie etwa die doppelte Größe erreicht hatten, gingen aber dann sehr rasch zur Wurzelbildung über. Teilte man nun die heranwachsenden Stücke rechtzeitig, so daß sie nie über 3 mm Durchmesser erreichten, dann unterblieb die Wurzelbildung vollständig. Auch Tracheideninseln konnten in diesem Fall nie beobachtet werden. In den Querschnitten zeigte sich immer ein völlig homogenes, parenchymatisches Gewebe.

Ob Dauerkulturen so kleiner Teile möglich sind erscheint noch fraglich. Die hier berichteten Befunde beziehen sich auf Kulturen, die sich über 3 Monate erstreckten. Dabei erfolgte alle 8 Tage eine Unterteilung und Übertragung auf neues Substrat. Gegen Ende dieses Zeitraums nahm die Wachstumsintensität stark ab und die Beobachtungen wurden eingestellt. Zur Entscheidung der Frage, ob die Abnahme des Wachstums auf einem Abklingen der Teilungsfähigkeit an sich oder, was wahrscheinlicher erscheint, auf einem Mangel in der Zusammensetzung des Nährbodens beruht, bedarf weiterer Versuchsreihen.

Im Zusammenhang mit diesen Befunden lassen sich einige Überlegungen zum Problem der Differenzierung anstellen. Wenn es richtig ist, daß unterhalb einer gewissen Größe eines Zellverbandes eine Differenzierung ausbleibt und nur gleichartiges Gewebe gebildet wird, so ist dies ein weiteres deutliches Beispiel für die Notwendigkeit des Zusammenwirkens zwischen inneren und äußeren Faktoren beim Differenzierungsvorgang. Dabei ist unter dem komplexen Begriff „innere Faktoren" die Gesamtheit der Reaktionsmöglichkeiten der Zelle zu verstehen, die durch die für die jeweilige Pflanzenart spezifische Konstitution des Plasmas gegeben ist. Da unter den gewählten Kulturbedingungen die äußeren Bedingungen wie Temperatur, Belichtung, Feuchtigkeit, Ernährung usw. weitgehend konstant waren, kann der „äußere Faktor", der zur Auslösung von Differenzierungserscheinungen führt, primär nur in der Vergrößerung des Zellverbandes infolge des

Wachstums gesehen werden. Während in hinreichend kleinen Zellkomplexen Sauerstoff- und Nährstoffversorgung für alle Zellen weitgehend gleichmäßig sein dürften, treten beim Größerwerden des Zellverbandes immer größere Unterschiede in dieser Beziehung ein. Die im Inneren des Gewebes liegenden Zellen werden ebenso wie die dem Nährboden anliegenden Zellen weniger gut mit Sauerstoff versorgt werden und dadurch auch eine Änderung ihres Atmungsstoffwechsels erleiden. Mit der Atmung gekoppelt ist aber das Auftreten elektrischer Potentiale, wie sie ROSENE u. LUND (1935) und LUNDEGÅRDH (1932) messen konnten. Mit der Entstehung von Potentialdifferenzen ist aber die Grundlage einer Polarität gegeben, die durch gerichteten Wirkstoff- und Nährstofftransport die Verschiedenheit der einzelnen Gewebeteile weiter verstärkt. Stellen wir uns nun vor, daß die allerdings noch hypothetischen, von den Kernen produzierten Determinationsstoffe auf Grund der Polarisierung nicht mehr gleichmäßig durch das ganze Gewebe diffundieren, sondern an den bevorzugten Stellen angereichert werden, so erscheint uns das Auftreten von Wurzeln und Tracheideninseln verständlicher.

Es sei noch betont, daß es sich in unserem Falle nicht um eine, etwa durch einen geoelektrischen Effekt, von außen induzierte, bipolare Polarität handelt, sondern um eine multipolare, wobei die Lage der einzelnen Pole durch die unterschiedlichen Stoffwechselbedingung der verschiedenen Gewebepartien bestimmt wird. Die Multipolarität kam durch das gleichzeitige Auftreten von mehreren Wurzeln, die gewöhnlich sternförmig nach verschiedenen Seiten ausstrahlten, besonders deutlich zum Ausdruck. Es ist müßig, darüber zu streiten, ob das Auftreten der Polarität als exogen oder endogen zu bezeichnen ist, da dies von der der Betrachtung zugrunde gelegten Organisationseinheit abhängig ist. Betrachtet man das ganze Gewebestück als Einheit, so erscheint die auftretende Polarität als endogen bedingt, da sich an den Außenbedingungen nichts änderte. Geht man aber von der einzelnen Zelle aus, so muß man die Polarität als exogen entstanden bezeichnen, da für diese die Umweltbedingungen in physikalischer und chemischer Beziehung durch die Volumzunahme des Gesamtgewebes verändert werden und die in der Zelle sich vollziehenden Stoffwechseländerungen damit von außen induziert werden.

2. Versuche zur Kultur von Karottengewebe.

Gleichzeitig mit den oben beschriebenen Kulturversuchen mit Sonnenblumenstengelgewebe wurde auch das von GAUTHERET (1939) wiederholt verwendete Karottengewebe in Kultur genommen. Es wurde auf dem gleichen Nährboden kultiviert wie das Sonnenblumengewebe. Da sich gegenüber jenem und den Beschreibungen GAUTHERETs keine

erheblichen Unterschiede ergaben, sollen die Ergebnisse hier nur knapp dargestellt werden.

Als Ausgangsmaterial dienten etwa 1 cm dicke Karotten der Sorte Marktgärtner. Nach gründlicher äußerer Reinigung wurden diese 10 min in konzentriertes Bromwasser gelegt, dann auseinandergebrochen und von der sterilen Bruchstelle mit dem Skalpell kleine Würfel von 3—4 mm Kantenlänge herausgeschnitten und auf einen Nährboden übertragen. Im Laufe der ersten 8 Wochen erfolgte nur ein sehr mäßiges Kalluswachstum, und erst nach diesem Zeitraum konnte die erste Unterteilung vorgenommen werden. Von da ab entsprach der Zuwachs dem der Sonnenblumengewebe weitgehend, und es entstanden ebenfalls Wurzeln, die sich genau wie bei jenen sekundär verdickten und als selbständige Kulturen weitergeführt werden konnten. Allgemein war aber die Häufigkeit der Wurzelbildung geringer als bei Sonnenblumengewebe.

Die Farbe der Gewebe ging von dem anfänglichen Rot nach einigen Tagen in ein fahles Gelb über. In Perioden besonders intensiven Wachstums nahmen die neu entstehenden Gewebeteile eine deutlich hellgrüne Färbung an, die aber bald wieder dem ursprünglichen Gelb wich. Die entstehenden Wurzeln waren stets rein weiß. Der augenblicklich noch in Kultur befindliche Stamm wurde am 3. 6. 48 angelegt und in Intervallen von anfänglich 14 Tagen, später 4 Wochen, auf neues Substrat übertragen. Bei 7 von insgesamt 18 Passagen erfolgte eine Unterteilung des Gewebes in je 2—4 Teile, so daß sich eine theoretische Zahl von 3^7 oder rund 2200 Unterkulturen ergibt. Da der Zustand der Kulturen ebenso wie der des Sonnenblumengewebes keinen Anlaß zu der Annahme eines baldigen Absterbens gibt, kann auch in diesem Falle angenommen werden, daß es sich wie bei den von GAUTHERET beschriebenen Stämmen um Dauerkulturen handelt[1]. Ein Weglassen des IES-Zusatzes hatte auch hier, wie beim Sonnenblumengewebe, ein Nachlassen der Zuwachsgeschwindigkeit zur Folge. Eine Gewöhnung an IES, wie sie GAUTHERET (1948) beschreibt, konnte bisher noch nicht beobachtet werden. Vermutlich ist dazu die Kulturdauer noch zu gering.

3. Versuche mit Stengelgewebe von Impatiens Sultani.

Nach den Erfahrungen mit Sonnenblumengewebe wurden von *Impatiens Sultani* Stengelteile mittleren Alters gewählt, die bereits eine gewisse Festigkeit erreicht hatten, deren Verholzung aber noch nicht so weit fortgeschritten war, daß ihre Zerteilung mit dem Skalpell Schwierigkeiten bereitet hätte. Die Entnahme der Gewebeteile erfolgte nach der oben beschriebenen Methode.

[1] Ebenso wie das Sonnenblumengewebe wurden auch die Kulturen von Karottengewebe seit Abschluß dieser Arbeit im März 1949 bis zu ihrer Drucklegung im Sommer 1950 weitergeführt und zeigen nach nunmehr 2jähriger Kulturdauer weiteres Wachstum.

Die isolierten Sektoren der Stengelquerschnitte zeigten nur in wenigen Fällen eine sehr schwache Kallusbildung und starben nach 3—4 Passagen ganz ab. Variationen in den Konzentrationen der Zusätze zum Nährboden und der Ersatz des Peptons durch reines Vitamin B_1 hatten keinen Erfolg. Dagegen trat eine überraschend schnelle und intensive Kallusbildung auf, wenn die ganzen, 2—3 mm dicken und nur der Epidermis entledigten Stengelquerschnitte verwendet wurden. In der Mehrzahl der Fälle entstand schon nach 2—3 Tagen über dem zentralen Mark eine rein weiße, rasch wachsende Wucherung, die sich im Laufe von 4 Wochen über den ganzen Querschnitt ausdehnte und sogar darüber hinaus wucherte. In Abb. 7 sind 2 derartige Stücke abgebildet, die den Entwicklungszustand nach 2 bzw. 4 Wochen Kulturdauer darstellen.

Abb. 7. Stengelstücke von *Impatiens Sultani* nach 2- bzw. 4wöchiger Kulturdauer.

Anatomische Untersuchungen sollten entscheiden, ob es sich, wie es bei äußerer Betrachtung den Anschein hatte, um Bildungen des Marks handelte oder ob die Wucherungen doch, wie bei den bisher untersuchten Geweben, von den Leitbündeln und dem benachbarten Parenchym ausgingen. Die Schnitte zeigten übereinstimmend, daß die Neubildungen nur vom Mark aus entstanden und sich über das Nachbargewebe hinwegschoben, ohne zunächst damit in Fusion zu treten. In Abb. 8 ist dieses Verhalten schematisch dargestellt, und im Vergleich dazu ist in Abb. 9 die entsprechende Darstellung der Kallusbildung, wie sie GAUTHERET (1947) bei Karotten beobachtete, wiedergegeben.

In den eigenen, bereits oben beschriebenen Kulturen von Karottengewebe konnte zwar der stärkste Zuwachs ebenfalls über den Meristemen der Leitbündel festgestellt werden, wie es GAUTHERET in Abb. 9 darstellt, aber ein so übersichtliches Verhalten lag nicht vor. Zunächst war das neugebildete Gewebe völlig homogen, und erst später traten Differenzierungen auf, die aber nur in seltenen Fällen Beziehungen zum Ausgangsgewebe aufwiesen, im übrigen regellos zerstreut lagen.

An die Stelle der Kallusbildung konnte bei erhöhten IES-Gaben Wurzelbildung treten. Die Wurzeln bildeten sich dann meist aus den peripheren Teilen des Stengelquerschnittes, in seltenen Fällen allerdings auch unmittelbar aus dem Mark. Die kallösen Neubildungen wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien vom Muttergewebe abgetrennt und isoliert weiterkultiviert. Sie behielten während der ersten 3 Passagen von je 14 Tage Dauer ihr rasches Wachstum bei und zeigten eine leicht hellgrüne Färbung. Dann klang das Wachstum ab, es konnte keine weitere Unterteilung vorgenommen werden und das Gewebe verfärbte

sich zu unansehnlichen, braunen Klumpen. Die besten Kulturen hatten eine Lebensdauer vom 10. 8. bis 10. 10. 48. Als Ende wurde der Zeitpunkt bezeichnet, an dem das gesamte Gewebe verfärbt war und keinerlei Zuwachs mehr zeigte. Daß man mit der Bezeichnung „abgestorben" vorsichtig sein muß, lehrten Erfahrungen mit Sonnenblumengewebe. Dieses kann häufig wochenlang keinerlei Zuwachs aufweisen und eine tiefbraune Färbung annehmen, um dann plötzlich wieder zu reger Kallusbildung überzugehen, ohne daß eine Ursache für diesen Aktivitätswechsel erkennbar ist. Daher wurden auch im Falle von *Impatiens* die Kulturen nach der Diagnose „abgestorben" nicht verworfen, sondern noch einmal auf frischen Nährboden übertragen und einige Wochen aufbewahrt. Es trat aber in diesen Fällen kein erneutes Wachstum auf, so daß man die Lebensdauer der hier beschriebenen Kulturen mit 3 Monaten angeben muß. Das gegenüber allen anderen bisher untersuchten Pflanzen ungewöhnliche Verhalten von *Impatiens* läßt sich wohl aus der Tatsache erklären, daß hier das Mark der Träger des sekundären Dickenwachstums ist. Troll (1948) stellt diese Art des sekundären Dickenwachstums als „medulläre Form" der allgemein verbreiteten „cambialen Form" gegenüber. Positive Versuchsergebnisse mit Markgewebe teilt nur Ulehla (1928) mit, der im Mark einer hundertjährigen Kaktee Zellteilungen auslösen konnte, aber keine Kallusbildung erhielt. Allgemein werden in der Literatur die Markzellen als ungeeignet für Gewebekulturen bezeichnet.

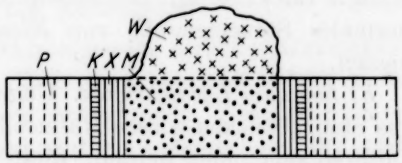

Abb. 8. Schematischer Längsschnitt durch ein 14 Tage in Kultur befindliches Stengelstück von *Impatiens Sultani*. *P* Parenchym und Phloem; *K* Kambium; *X* Xylem; *M* Mark; *W* neu entstandene Wucherung.

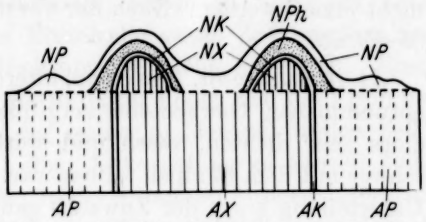

Abb. 9. Schnitt durch einen in Gewebekultur gehaltenen Querschnitt einer Karotte. *AP* Altes Parenchym; *AX* altes Xylem; *AK* altes Kambium; *NP* neues Parenchym; *NK* neues Kambium; *NX* neues Xylem; *NPh* neues Pholem (nach Gautheret).

4. Weitere Versuche mit Stengelgewebe verschiedener Pflanzenarten.

Nach der ausführlichen Beschreibung der bisherigen Versuche soll im folgenden nur eine kurze Übersicht über die außerdem noch untersuchten Arten und die Möglichkeit ihrer Verwendung für Gewebekulturen gegeben werden.

a) *Nicotiana tabacum*. Das Wachstum des isolierten Stengelgewebes entsprach dem von *Helianthus* beschriebenen; nur war die Neigung zur

Wurzelbildung geringer. Sekundäre Wurzelbildung wurde nur in 2 Fällen beobachtet. Passagenkulturen konnten mit einem Stamm vom 15. 7. bis 30. 11. 48 durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt ging der gut wachsende Stamm durch eine, bei der Übertragung auf neues Substrat erfolgte Infektion mit Schimmelpilzen verloren. Allgemein scheint sich normales Stengelgewebe von *Nicotiana* gut für Gewebekulturen zu eignen.

b) Solanum Lycopersicum. Ungefähr 10% der isolierten Gewebeteile aus Stengelstücken wiesen Kallusbildung auf und konnten in Passagenkulturen genommen werden. Eine Verdoppelung des Volumens erfolgte durchschnittlich in 4 Wochen. Die Wurzelbildung war schwach. Sekundäre Verdickung der Wurzeln trat selten auf. Ebenso wie der Stamm von *Nicotiana* gingen auch diese Kulturen, die mit jenen gleichalterig waren, am 30. 11. 48 durch Infektion verloren. Wahrscheinlich lassen sich auch mit Tomatengewebe echte Dauerkulturen erzielen.

c) Datura chlorantha. Nur 3—5% der isolierten Teile zeigten Zuwachs. Die Wucherungen entstanden ausschließlich aus dem Parenchym und waren außerordentlich locker und brüchig. Differenzierungen traten in den ersten Wochen nicht auf. Dauerkulturen konnten nicht erzielt werden. Nach der zweiten Unterteilung des Gewebes starb dieses ab.

d) Althaea rosea. Die einem älteren, bereits stark verholztem Stengel entnommenen Gewebeteile vergrößerten sich langsam unter Bildung eines sehr dichten, rasch und stark verholzenden Gewebes, das nur schwer mit dem Skalpell teilbar war. Nach 8 Passagen und zweimaliger Unterteilung hörte der Zuwachs ganz auf und die Beobachtung wurde eingestellt.

e) Pelargonium zonale. Aus den Stengelteilen diffundierte Anthocyan in den Nährboden und färbte diesen intensiv rot. Zuwachs konnte in keinem Falle beobachtet werden.

Ebenfalls negativ verliefen Versuche mit *Coleus arabicus, Bryophyllum tubiflorum, Solanum Hendersoni, Pisum sativum, Tagetes pinnata* und *Hedera Helix.*

Sowohl die hier angeführten positiven Kulturversuche als auch die in der Literatur beschriebenen wurden mit Gewebe dicotyler Pflanzen ausgeführt. Dagegen fehlen Mitteilungen über erfolgreiche Kulturen monocotylen Pflanzengewebes. Dieser Tatsache wurde natürlich besondere Aufmerksamkeit geschenkt und zahlreiche Kulturversuche mit Gewebe von Vertretern der Monocotylen, besonders der Gattungen *Tradescantia, Commelina, Musa* (Blattstiel), *Orchis* und verschiedener *Araceen,* ausgeführt. Bei gleicher Methodik wie bei Geweben dicotyler Pflanzen zeigten sich in hunderten von Versuchen niemals irgendwelche

Kallus- oder Wurzelbildungen. Die Ursache dieser Mißerfolge mag mit der Tatsache in Zusammenhang stehen, daß den Monocotylen ein sekundäres Dickenwachstum fehlt.

5. Kulturversuche mit Rhizomgewebe.

Über erfolgreiche Kulturen von Rhizomgewebe berichten GAUTHERET (1947) und NOBÉCOURT (1938). Im Verlauf vorliegender Arbeit wurde ebenfalls dieses Material zu Versuchen herangezogen. Aus dem Inneren der Rhizome verschiedener Pflanzen wurden entsprechend der oben beschriebenen Methodik Gewebeteile entnommen und auf die üblichen Nährböden übertragen. Mit Ausnahme einiger Gewebeteile aus dem Rhizom von *Helleborus niger*, die sehr schwachen Zuwachs zeigten, waren alle Versuche negativ. Verwendet wurden folgende Arten: *Rodgersia tabularis*, *Saxifraga tellimoides*, *Nuphar luteum*, *Rheum palmatum*, *Helleborus niger* und *Helleborus olympicus*.

6. Kulturversuche mit Blattgewebe.

Angeregt durch die Mitteilung SCHMUCKERs (1929), daß es möglich sei, isolierte Mesophyllzellen von *Bocconia cordata* in vitro zur Vermehrung zu bringen und aus einer Einzelzelle ganze Zellkomplexe zu züchten, wurden auch in dieser Richtung Versuche angestellt. Eine teilweise Bestätigung der Befunde SCHMUCKERs findet sich bei FIEDLER (1939), der angibt, bei etwa 40% der isolierten Mesophyllzellen Zellteilung beobachtet zu haben. Von einer Entwicklung zu ganzen Zellhaufen ist dabei aber nicht die Rede. In der gesamten übrigen Literatur werden diese Befunde kaum erwähnt, und WHITE (1943) weist darauf hin, daß sie der erneuten Bestätigung bedürften.

Von Ende Mai bis Juli 1948 wurde wiederholt versucht, derartige Zellen in Kultur zu nehmen. Blätter verschiedenen Alters dienten als Ausgangsmaterial. Nach Reinigung der Oberfläche mit Seifenlauge und sehr schwachem Bromwasser wurde die Epidermis ein Stück abgezogen und aus dem freigelegten Schwammparenchym mit einer sterilen Lanzettnadel ein kleines Stück herausgestochen. Dieses wurde in einem sterilen Wassertropfen aufgeschwemmt, wobei sich die Mesophyllzellen nach kurzem Hin- und Herreiben fast vollständig voneinander lösten und eine Suspension von Einzelzellen entstand. Nachdem auf ein Deckglas unter sterilen Kautelen ein durch 0,75% Agar verfestigter Tropfen einer Nährlösung gegeben worden war, wurde mit einer Impfnadel eine Öse der Suspension darauf übertragen und das Deckglas mittels eines Vaselineringes auf einen hohlgeschliffenen Objektträger aufgeklebt. Die so angelegten Kulturen konnten nun bequem unter dem Mikroskop bei mittlerer Vergrößerung beobachtet werden.

Bei den ersten, Ende Mai ausgeführten Versuchen ergab sich, daß die Zellen der noch in Entwicklung begriffenen Blätter sich nur sehr unvollständig voneinander lösten und viele größere Klumpen entstanden. Außerdem zeigten fast 100% der Zellen irreversible Reizplasmolyse, so daß sie für weitere Versuche wertlos waren.

Bei späteren, mit voll entwickelten Blättern ausgeführten Versuchen gelang die Isolierung der Mesophyllzellen ohne Schwierigkeiten, aber auch jetzt zeigte ein hoher Prozentsatz der Zellen Plasmolyseerscheinungen. Daher sollte zunächst untersucht werden, von welchen äußeren, vielleicht vermeidbaren Umständen diese abhingen. Daß es sich nicht um eine normale Plasmolyse durch eine hypertonische Außenlösung handelte, ging daraus hervor, daß der kryoskopisch bestimmte osmotische Wert der Nährlösung bei 1,8—2,0 Atm. lag, während kryoskopische Messungen an Preßsäften verschieden alter Blätter Werte zwischen 5,0 und 8,0 Atm. ergaben. Danach hätten die Zellen in den verwendeten Nährmedien eher platzen als schrumpfen müssen. Es mußte sich daher um eine der in der Literatur als Reizplasmolyse bezeichneten Erscheinungen handeln, deren Mechanik allerdings noch gänzlich ungeklärt ist. Als Reiz konnte sowohl die mechanische Isolierung der Zellen selbst, als auch der Wechsel der Außenbedingungen der einzelnen Zellen angesehen werden. Inwieweit der zweite Punkt von Einfluß war, sollten folgende Versuchsreihen zeigen:

In Wassertropfen verschiedener Glukose- und IES-Konzentrationen wurde je eine Öse Zellsuspension gegeben und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach 2 Std erfolgte die Auszählung der plasmolysierten Zellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Abhängigkeit der Plasmolyse isolierter Mesophyllzellen von Glukose- und IES-Konzentration.*

Zusätze zur Aqua dest.	Keine	Glukose				4 % Glukose + Heteroauxin ... je Liter			
		1 %	2 %	4 %	6 %	0,1 g	10 mg	1,0 mg	0,1 mg
Plasmolysierte Zellen in Prozent . . .	95	80	70	60	70	90	80	65	60

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wirken Aqua dest. und höhere IES-Konzentrationen ungünstig auf die Zellen ein. Daher wurden für die späteren Versuche zu der für die Gewebekulturen üblichen mineralischen Grundnährlösung 4% Glukose und 1 mg IES je Liter zugesetzt. In einigen Versuchsreihen kam an Stelle von IES ein Zusatz von Reibsaft, der nach den Angaben von SCHMUCKER (1929) aus jungen Sprossen hergestellt worden war, zur Verwendung. Die Konzentration des Reibsaftes wurde in weiten Grenzen zwischen 1:2 und 1:100 variiert. Von

den mit verschiedenen Zusätzen versehenen Nährböden wurden Reihen mit jeweils 10 Deckglaskulturen angelegt. Durchschnittlich erlitten 50—60% der isolierten Zellen Plasmolyse. Das Plasma verdichtete sich, die Chloroplasten zerfielen, und später waren von diesen Zellen nur noch die Membranen deutlich erkennbar. Die anderen Zellen zeigten dagegen normales Aussehen: die Plastiden blieben scharf abgegrenzt erhalten, und in einigen Fällen konnte auch eine geringe Verlagerung der Chloroplasten bei Beleuchtungswechsel beobachtet werden. Zur Vermeidung von Verwechslungen der einzelnen beobachteten Zellen wurde aus jeder Kultur mit Hilfe eines Zeichenapparates eine bestimmte Stelle skizziert und bei der allwöchentlichen Durchsicht der Objekte diese mit der Skizze verglichen.

Trotz monatelanger Beobachtung und zweimaliger Wiederholung der Versuche konnte in keinem Falle auch nur die Andeutung einer Zellteilung beobachtet werden. Auch eine allgemeine Vergrößerung der Zellen, wie sie v. Guttenberg (1943) bei Narbenschleimzellen von *Cymbidium* nach IES-Zusatz beobachten konnte, trat nicht ein. Um zu kontrollieren, ob die Zellen, deren Aussehen sich nach wochenlanger Kulturdauer nicht verändert hatte, überhaupt noch lebten, wurden nach 2 Monaten die Hälfte der Kulturen in einmolare KNO_3-Lösung übertragen und die Zellen auf ihre Plasmolysierbarkeit geprüft. 90% der normal aussehenden Zellen waren nach 30 min deutlich plasmolysiert, und nach Übertragung in Aqua dest. ging die Plasmolyse bei 80% der Zellen wieder zurück. Sie konnten damit als noch lebend bezeichnet werden.

Im Laufe der weiteren Beobachtung der restlichen Kulturen traten bei immer mehr Zellen Plasmaverdichtungen auf. Die grüne Farbe der Chloroplasten begann zu schwinden und ein am 10. 12 ausgeführter Plasmolyseversuch verlief negativ. Die Zellen waren also inzwischen abgestorben. Die Lebensdauer der isolierten Mesophyllzellen von *Bocconia cordata* kann man also bei der hier beschriebenen Versuchsanordnung mit etwa 3 Monaten angeben. Wesentlich kürzer war die Lebensdauer der Zellen nur in den Fällen, wo stärkere Reibsaftkonzentrationen als 1:10 angewendet wurden. In diesen Fällen starben die Zellen schon in den ersten Wochen ab.

Ähnliche Versuche, aber mit weniger umfangreichem Material, wurden auch mit Mesophyllzellen von *Lamium purpureum*, einem Material, das schon Haberlandt (1902) verwendete, ausgeführt. Auch diese Zellen konnten 3—4 Monate am Leben erhalten werden, waren aber nicht zur Zellteilung zu veranlassen, obwohl Zusätze von Reibsaft, Hefeextrakt, Vitamin B_1, IES und α-Naphtylessigsäure angewendet wurden.

Nach der zufällig gemachten Beobachtung, daß sich auch die Mesophyllzellen von *Sedum acre* leicht isolieren lassen, wurden auch diese Zellen zu Kulturversuchen verwendet. Sie erwiesen sich aber als noch untauglicher und starben schon nach spätestens 4 Wochen ab.

Da sich die Versuche mit Einzelzellen so wenig erfolgreich gestalteten, sollte als weitere Möglichkeit, Gewebekulturen von Blattgewebe zu realisieren, noch versucht werden, mit größeren Zellkomplexen zu arbeiten. Dazu wurden Blätter von *Sedum pachyphyllum* und *Bryophyllum tubiflorum* verwendet, aus deren Innerem kleine Stücke steril entnommen wurden. Bei gleicher Behandlung wie sie bei Stengelgewebekulturen beschrieben wurde, starben die Blattgewebe nach 14 Tagen ab, ohne Neubildungen hervorzubringen. Somit müssen alle eigenen Versuche zur Kultur isolierten Blattgewebes als negativ bezeichnet werden. Da sich auch in der Literatur außer den älteren Angaben Schmuckers (1929) keine positiven Berichte über Blattgewebekulturen und Kulturen von einzelnen Zellen finden, bleibt dieses Problem weiterhin eine Zukunftsaufgabe der pflanzlichen Gewebezüchtung. Vielleicht wird es eines Tages ebenso gelöst, wie das der lange Zeit für unmöglich gehaltenen Kultur von Stengelgewebe.

Zusammenfassung.

1. Normales Stengelgewebe von *Helianthus annuus* konnte auf einem synthetischen Nährboden bei Zusatz von 1 mg IES und 10 mg Pepton Witte je Liter in unbegrenzter Dauerkultur gehalten werden. Die dabei auftretenden Differenzierungen werden beschrieben.

2. Bei Kulturen von Stengelgewebe von *Impatiens Sultani* konnte eine vom Mark ausgehende Kallusbildung beobachtet werden.

3. Weiter positive Kulturversuche mit Gewebeteilen von Karotten, *Nicotiana tabacum*, *Solanum Lycopersicum*, *Datura chlorantha* und *Althaea rosea* werden beschrieben.

4. Versuche zur Kultur von Rhizomgewebe und verschiedener Gewebeteile monocotyler Pflanzen verliefen negativ.

5. Isolierte Mesophyllzellen von *Bocconia cordata*, *Lamium purpureum* und *Sedum acre* konnten monatelang am Leben erhalten werden, zeigten aber keine Zellteilung.

Herrn Prof. Dr. K. Suessenguth und Herrn Ministerialrat Prof. Dr. G. Seiffert bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und freundliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Literatur.

Bonner, J., and F. Addicott: Bot. Gaz. **99**, 144 (1937). — Bünning, E.: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanzen. Berlin: Springer 1948. — Bünning, E., u. H. Sagronsky: Z. Naturforschg **3b**, 203 (1948). — Fiedler, H.: Z. Bot. **33**, 369 (1939). — Gautheret, R.: C. r. Acad. Sci. Paris **205**, 572 (1937);

208, 1340 (1939); **210**, 186 (1940); **211**, 15 (1940); **226**, 270 (1948). — Sixth Growth Symposium **1947**, 21. — GUTTENBERG, H. v.: Planta (Berl.) **33**, 576 (1943). — HABERLANDT, G.: Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math.-naturwiss. Kl. **111**, 69 (1902). HARTMANN, M.: Allgemeine Biologie. Jena 1947. — HILDEBRANDT, A., and B. DUGGAR: Amer. J. Bot. **32**, 357 (1945). — KANDLER, O.: Naturwiss. Rdsch. **1**, 28 (1948). — KOTTE, W.: Beitr. allg. Bot. **2**, 209 (1922). — Ber. dtsch. bot. Ges. **40**, 269 (1922). — LUNDEGÅRDH, H.: Die Nährstoffaufnahme der Pflanzen. Jena 1932. MIEHE, H.: Arch. exper. Zellforschg **6**, 366 (1929). — NOBÉCOURT, P.: Bull. Soc. bot. France **85**, 490 (1938). — C. r. Soc. Biol. Paris **130**, 130 (1939). — RECHINGER, C.: Abh. Zool.-Bot. Ges. Wien **43**, 310 (1893). — RICKER, A., and A. GUTSCHE: Amer. J. Bot. **35**, 227 (1948). — ROBBINS, W. J.: Bot. Gaz. **73**, 376 (1922); **78**, 209 (1924). — ROPP, S. DE: Nature (Lond.) **158**, 555 (1946). — ROSENE, H., u. E. LUND: Plant Physiology **10**, 27 (1935). — SCHANDERL, H.: Botanische Bakteriologie. Stuttgart 1947. — SCHMUCKER, TH.: Planta (Berl.) **9**, 339 (1929). — STAPP, C.: Naturwiss. **34**, 81 (1947). — TROLL, W.: Allgemeine Botanik. Stuttgart 1948. — ULEHLA, V.: Arch. exper. Zellforschg **6**, 370 (1928). — WHITE, R. P.: Plant Physiology **7**, 613 (1932); **9**, 585 (1934); **17**, 153 (1942). — Amer. J. Bot. **25**, 223 (1938); **26**, 59 (1939). — A handbook of plant tissue culture. New York 1943. — Botanic. Rev. **12**, 521 (1946). — WHITE, R. P. and A. G. BRAUN: Science (Lancaster, Pa.) **94**, 239 (1941). — ZUPPINGER, A.: Schweiz. med. Wschr. **1947**, 767.

Dr. OTTO KANDLER, München 38, Menzingerstr. 67.

Planta, Bd. 38, S. 586—590 (1950).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock.

BEITRÄGE ZUR MORPHOLOGIE VON PHYLLANTHUS NIRURI L.

Von

BERNHARD KAUSSMANN.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. August 1950.)

Die eigenartige Wuchsform der verschiedenen *Phyllanthus*-Arten hat schon mehrere Forscher beschäftigt, so z. B. BRAVAIS (2, S. 1), HOFMEISTER (8. S. 405). ASKENASY (1), DINGLER (3), GOEBEL (4 u. 5), TROLL (10, S. 328) u. a. Einmal interessierten die in der Sektion *Xylophylla* vorkommenden Flachsprosse, ferner die auffallenden phyllotaktischen Verschiedenheiten von Haupt- und Seitenachsen anderer Sektionen. Als einjährig[1] und tropisch-kosmopolitisch wird von PAX und HOFFMANN (9) der zur Sektion *Euphyllanthus* gehörige *Phyllanthus Niruri* L. beschrieben. Da es sich um eine morphologisch beachtenswerte Pflanze handelt, soll auf die Entwicklungsgeschichte und auf ihre morphologischen Sonderheiten näher eingegangen werden.

Die Keimung erfolgt epigäisch, die Kotyledonen (Abb. 1, I, *Co*) werden also durch Längenwachstum des Hypokotyls (*Hy*) an die Oberfläche gebracht und bilden die ersten Assimilationsorgane. Eine schwache Primärwurzel[2] (*Hw*), die zahlreiche Seitenwurzeln (*Sw*) ausgliedert, verankert die Pflanze im Boden. Auf die Keimblätter folgen sofort Laubblätter, die mit zwei pfriemligen Nebenblättern versehen sind. Die junge Pflanze zeigt in der Seitenknospenentwicklung ein akrotones Verhalten. In den Achseln der Kotyledonen konnte ich keine Anlagen wahrnehmen, dagegen werden in B_1 und B_2 die Knospen angelegt, kommen jedoch nicht zur Entwicklung. Die Knospen von B_3 und B_4 treiben aus und bilden die Seitensprosse S_1 und S_2, die weiter unten zu behandeln sein werden. Bei den folgenden Blättern der Hauptachse rudimentiert das Oberblatt und nur die Stipel treten in Erscheinung, so daß die Blätter überhaupt zu fehlen scheinen. Aus den Achseln dieser rudimentären Blätter entwickeln sich weitere Seitensprosse (S_3, S_4 ....). Die Keimpflanze von *Flueggea microcarpa* verhält sich ganz ähnlich, wie TROLL (10, S. 328) zeigen konnte. Die Zone der wohlentwickelten Laubblätter an der Hauptachse ist hier weit ausgedehnter und erst ältere Pflanzen zeigen schuppenartige Laubblätter. Stellt man

[1] In unseren Gewächshäusern ist die Pflanze meist mehrjährig.

[2] Wir bedienen uns des von TROLL (11, S. 450) vorgeschlagenen Ausdrucks.

sich vor, daß bei *Flueggea* die Zahl der normal ausgebildeten Laubblätter vier nicht übersteigt und daß dann rudimentäre Laubblätter folgen, so ergibt sich das Verhalten von *Phyllanthus Niruri*.

Was nun die Stellung der Blätter an der Hauptachse anlangt, so sei auf das Diagramm Abb. 1, IV, verwiesen. Die Symmetrie der Sproßachse ist auch hier für das Verständnis der Blattstellung von größter

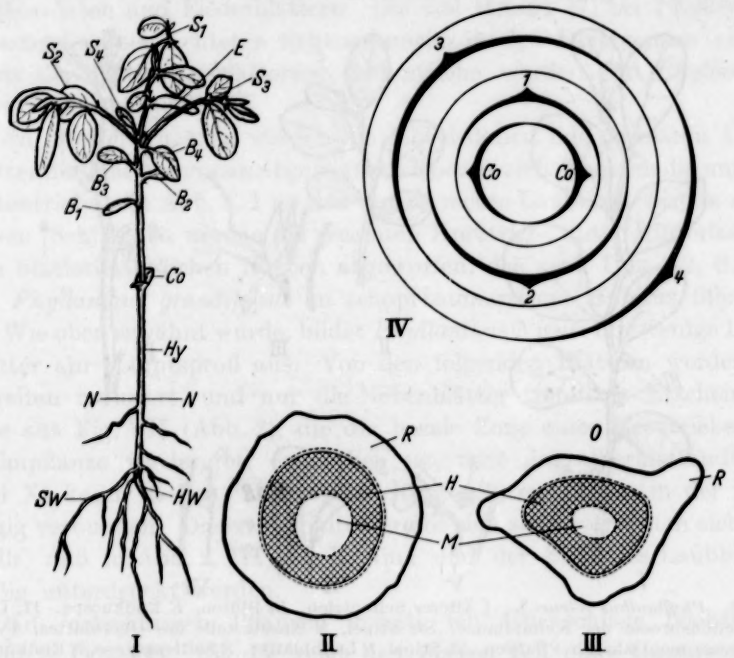

Abb. 1. *Phyllanthus Niruri* L. I Keimpflanze mit laubig beblätterter Zone am Hauptsproß *NN* Bodenniveau, *Hw* Primärwurzel, *Sw* Seitenwurzeln, *Hy* Hypokotyl, *Co* Kotyledonen B_1—B_4 Laubblätter, S_1—S_4 Seitensprosse, *E* Endknospe. II Querschnitt durch den Hauptsproß und III durch eine Seitenachse, *O* Oberseite, *R* Rinde, *H* Holzkörper, *M* Mark. IV Diagramm der Blattstellung am Hauptsproß der Keimpflanze.

Bedeutung. Auf die beiden einen Wirtel bildenden Keimblätter (*Co* in IV) folgen die Laubblätter, die über eine kurze distiche Zone zur Dispersion übergehen. Sie folgen also der von Haccius (6, S. 58) als *Vicia*-Typus bezeichneten Form. Blatt 1 und 2 (Abb. 1, IV) besitzen eine Divergenz von 180°. Blatt 3 und 4 zeigen bereits eine deutliche Abweichung, so daß die Distichie auf B_1 und B_2 beschränkt bleibt. Die an älteren Pflanzen ausgebildeten Seitentriebe weisen eine $^2/_5$ Stellung auf, so daß also auch die rudimentären Laubblätter der Hauptachse, anderen Achseln ja die Seitensprosse stehen, einen Quincunx bilden. Die zerstreute Blattstellung macht sich in der Symmetrie des Hauptsprosses bemerkbar, von dem ein Querschnitt in Abb. 1, II wiedergegeben

ist. Wie wir sehen, ist der Hauptsproß radiär ausgebildet, also kreisrund, und somit sind auch die eben geschilderten Blattstellungsverhältnisse zu verstehen.

Wenden wir uns nun den kurztriebartigen Seitensprossen zu, so können wir feststellen, daß eine auffallende Stellungsverschiedenheit der Blätter gegenüber der Hauptachse zu bemerken ist, eine Tatsache, die wie noch zu zeigen sein wird, wiederum von den Symmetrieverhältnissen

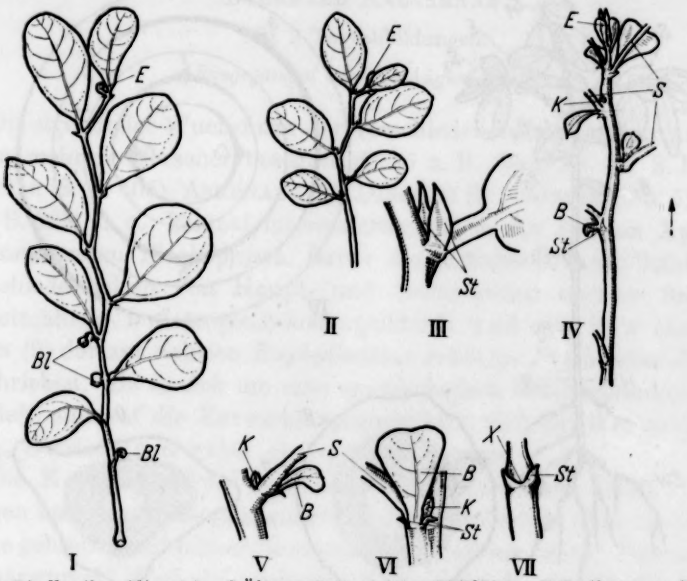

Abb. 2. *Phyllanthus Niruri* L. I Älterer Seitentrieb, *Bl* Blüten, *E* Endknospe. II, III u. VII Seitensprosse der Keimpflanze, *St.* Stipel, *x* Ansatzstelle des Oberblattes. IV bis VI Sprosse mehrjähriger Pflanzen, *St.* Stipel, *B* Laubblätter, *S* Seitensprosse, *E* Endknospe, *K* Beiknospen.

der Achse abhängig ist. Ein älterer Kurztrieb ist in Abb. 2, I und ein jüngerer der Keimpflanze in Abb. 2, II wiedergegeben. Man glaubt Fiederblätter vor sich zu haben, und erst eine genauere morphologische Analyse belehrt uns, daß es sich um eine totale Distichie der Blätter an den Seitenachsen handelt, wozu man bei TROLL (10, S. 456) und HACCIUS (6, S. 132) vergleiche. Die Laubblätter stehen zweizeilig. An ihrer Basis sitzen zwei kleine Stipel (Abb. 2, II und III), die später vertrocknen und nur noch als unscheinbare Reste wahrzunehmen sind.

Der Kurztrieb endet mit einer Endknospe (*E*), die nach einer gewissen Zeit ihr Wachstum einstellt. Die Seitensprosse älterer Pflanzen zeigen im Prinzip das gleiche Verhalten (Abb. 2, I), nur tragen sie zahlreicher Blätter, in deren Achseln Blüten (*Bl* in I) ausgebildet werden. Wir haben ein Verhalten vor uns, wie es TROLL (10, S. 328) für *Phyllanthus grandifolius* schildert. Wie wir schon sahen, ist die Blattstellung von den

Symmetrieverhältnissen abhängig. Wir müssen also im vorliegenden Falle annehmen, daß zwischen der Symmetrie der Hauptachse und der Seitensprosse ein Wechsel stattgefunden hat. Darüber gibt uns ein Querschnitt (Abb. 1, III) durch einen kurztriebartigen Seitensproß Auskunft. War der Hauptsproß radiärsymmetrisch, so lassen die Seitenachsen Dorsiventralität erkennen. Durch die totale Distichie ergeben sich demnach habituelle Ähnlichkeiten zwischen Kurztrieben der *Phyllanthus*-Arten und Fiederblättern. Die von HENRY (7) bei *Phyllanthus angustifolius* beobachteten Schwankungen in den Divergenzen an der Basis der distich beblätterten Seitentriebe wurden für *Phyllanthus Niruri* nicht festgestellt.

An älteren Pflanzen werden die Kotyledonen und primären Laubblätter des Hauptsprosses abgeworfen. Ebenso verhalten sich die unteren Seitentriebe. In Abb. 2, I ist das untere rechte Laubblatt bereits abgefallen. Schließlich werden die gesamten Kurztriebe unter Hinterlassung von blattstielähnlichen Narben abgeworfen, das nach ULE (12, S. 128) bei *Phyllanthus grandifolius* zu schopfbaumartigem Habitus führt.

Wie oben erwähnt wurde, bildet *Phyllanthus Niruri* nur wenige Laubblätter am Hauptsproß aus. Von den folgenden Blättern werden die Spreiten reduziert, und nur die Nebenblätter treten in Erscheinung. Wie aus Fig. VII (Abb. 2), die die basale Zone eines Kurztriebes der Keimpflanze wiedergibt, ersichtlich ist, tritt das Oberblattrudiment (bei X) kaum hervor. Die beiden Stipel (*St*) erscheinen in der Mitte bogig verbunden. Dieses Verhalten ergibt sich aber, wenn man sich vorstellt, daß in Abb. 2, III die Lamina und der Stiel des Laubblattes völlig unterdrückt werden.

An mehrjährigen Pflanzen konnte ich Rückschläge beobachten (Abb. 2, IV—VI). Fig. IV zeigt den oberen Teil eines Hauptsprosses (die Seitensprosse sind übersichtshalber weggelassen), an dem verschieden ausgebildete Laubblätter wahrzunehmen sind. Während am untersten Seitensproß nur die Stipel zu sehen sind, werden nach der Spitze zu, also in Richtung des Pfeiles, immer größere Spreiten ausgebildet. Das gleiche ist auch aus den vergrößerten Zeichnungen V und VI zu entnehmen. Eine ausgeprägte Stielzone ist nicht zu erkennen, was nicht verwunderlich ist, da ja auch die Stiele der Laubblätter an der Keimpflanze (Abb. 1, I) relativ kurz bleiben. An der Endknospe (Abb. 2, IV, *E*) sind ebenfalls ausgebildete Laubblätter zu erkennen. Die Sproßspitzen älterer Pflanzen zeigen also ein Verhalten, das bei der Keimpflanze die Regel ist.

Ferner sind bei älteren Sprossen Beiknospen (*K*) zu finden (Abb. 2, IV—VI), die eine akrotone Förderung zeigen und als Organreserven aufzufassen sind, da sie bei Verletzung der Sprosse auszutreiben vermögen.

Literatur.

1. Askenasy, E.: Botanisch-morphologische Studien. (1. Beiträge zur Kenntnis der flachen Stämme.) Frankfurt 1872. — 2. Bravais, L. u. A.: Essai sur la disposition générale des feuilles rectisériées. Ann. des Sci. nature, 2 sér. Bot. **12**, 1 (1839). — 3. Dingler, H.: Die Flachsprosse der Phanerogamen. Heft 1. *Phyllanthus* Sekt. *Xylophylla*. München 1885. — 4. Goebel, K.: Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen. Leipzig u. Berlin 1908. — 5. Goebel, K.: Organographie der Pflanzen, 3. Aufl. Jena 1928—1933. — 6. Haccius, B.: Untersuchungen über die Bedeutung der Distichie für das Verständnis der zerstreuten Blattstellung bei den Dikotylen. Bot. Arch. **40** (1939). — 7. Henry, A.: Knospenbilder, ein Beitrag zur Kenntnis der Laubknospen. Abt. 1: Dikotyledonen. Nova Acta Acad. Leopold.-Carol. **22**, 169 (1847). — 8. Hofmeister, W.: Allgemeine Morphologie der Gewächse. In Handbuch der physiologischen Botanik, Bd. 1. Leipzig 1868. — 9. Pax u. Hoffmann: Euphorbiaceae. In Engler-Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2. Aufl., 19c. 1931. — 10. Troll, W.: Vergleichende Morphologie der höheren Pflanzen, Bd. 1, Teil 1. Berlin 1937. — 11. Troll, W.: Über die Grundbegriffe der Wurzelmorphologie. Österr. Bot. Z. **96** (1949). — 12. Ule, E.: Über einige eigentümliche Zweigbildungen der Bäume des Amazonasgebietes. Ber. dtsch. bot. Ges. **33** (1915).

Dr. B. Kaussmann, Rostock, Doberanerstr. 143 (Botanisches Institut).

Planta, Bd. 38, S. 591—600 (1950.)

Aus dem Botanischen Institut Köln.

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER BENETZBARKEIT VON BLATTOBERFLÄCHEN.

Von

H. F. Linskens.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. August 1950.)

Das Verhalten von Pflanzenoberflächen gegenüber tropfbar-flüssigem Wasser ist seit Sachs und Molisch schon wiederholt Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Insbesondere im Zusammenhang mit der Frage der Tauwasseraufnahme durch das intakte Blatt (Literatur bei Steubing 1948, Schrödter 1950) und des Welkens und Wiederstraffens von Blättern (Delf 1911, Wetzel 1924) wurde immer wieder ein unterschiedliches Verhalten der Pflanzen gegenüber Wasserberührung bemerkt und beschrieben. Auch die Wasseraufnahme der Lebermoose ist eingehend unter dem Gesichtspunkt der Benetzbarkeit geprüft (Conaha 1939, McClee 1939, Isaac 1941).

Schon flüchtige Beobachtung der Vegetation nach Niederschlägen in flüssiger Form läßt Blätter unterscheiden, die mit einem geschlossenen Wasserfilm überzogen sind. Andere Blattlamina sind scheinbar trocken geblieben: das aufgefallene Wasser ist in Tropfen zusammengelaufen und abgerollt. Während man diese Blätter als unbenetzbar bzw. schlecht benetzbar bezeichnet, kann man jene benetzbar bzw. gut benetzbar nennen. Dieses wechselnde Verhalten wirkt sich bei der Gesamtheit der Blätter eines Baumes, der Krone, sogar bis in eine Beeinflussung der Niederschläge unter dem geschlossenen Laubdach aus (Linskens 1950). — Während Knothe (1902) und Avano (1909—1911) auf Grund rein anatomischer Untersuchungen durch Bestimmung der Kutikuladicke größenmäßige Beziehungen für die Benetzbarkeit aufzufinden suchten, ermittelten Wetzel (1924) und Krause (1935) durch Eintauchen und anschließende Wägung die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme und bekamen so einen Wert, der indirekt auch eine Größe für die Benetzbarkeit der betreffenden Flächen implizierte. Denn „Vorbedingung für die Wasseraufnahme ist nur die Benetzbarkeit der Cuticula“ (Wetzel 1924). Die Benetzbarkeit ist von der Struktur der Blattoberfläche abhängig. Die älteren Angaben darüber, bei Linsbauer (1930) zusammengefaßt, vermögen jedoch kein Bild über größenmäßige Beziehungen zwischen Benetzbarkeit und Natur der Epidermisauflagerungen zu geben. Neuerdings hat Ziegenspeck (1942) durch Untersuchungen mit dem

Auflichtmikroskop den Vorgang der Benetzung besonders an bewachsten Blättern beobachtet und von der Art der zugesetzten Netzmittel auf die physikalische Chemie der Kutikularsubstanzen geschlossen, ohne jedoch größenmäßige Werte der Benetzbarkeit zu berichten.

Erste Freilandbeobachtungen in den Sommern 1947 und 1948 ließen vermuten, daß es sich bei der Benetzbarkeit nicht nur um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Erscheinung an Blattoberflächen handelt. Vielmehr muß sie eine meßbare Größe sein, die für die verschiedenen Pflanzenarten zwar typisch, aber im Laufe der Entwicklung und des Wachstums einer charakteristischen Änderung unterworfen ist. Es lag daher nahe, nach einer Methode zu suchen, die es gestattet, eine zahlenmäßige Aussage über die Benetzbarkeit von Pflanzenoberflächen gegenüber Wasser zu machen.

Physikalische Grundlagen.

Die Benetzbarkeit ist ein Oberflächenphänomen. Eine allgemeine Literaturzusammenfassung über die Physik und Chemie der Oberflächen gibt Adam (1946). Grenzflächen zwischen Räumen verschiedener Stoffe bedeuten einen Sprung in der molekularen Raumerfüllung (v. Eichborn 1949) und unterliegen eigenen Gesetzen von denen besonders der Vorgang der Grenzflächenschrumpfung interessiert. Treffen Stoffräume zusammen, von denen einer in flüssigem Zustand sich befindet, der andere eine feste Unterlage oder Wand darstellt, so ist neben der Ausbildung einer formstabilen Berührungs*fläche* die Entstehung einer Berührungs*linie* kennzeichnend. Während die Ausbildung der freien Flüssigkeitsgrenzfläche nach autonomen Gesetzen eindeutig vonstatten geht, wird die Ausbildung der Randlinie oft mehrdeutig (vgl. v. Eichborn 1944a und b). Form- und Volumbedingungen der Haftfläche, sowie die Stoffarten der beiden anderen Medien bestimmen den *Randwinkel*, unter dem sich die drei Stoffflächen begegnen. Im nachstehenden wird, in Übereinstimmung mit Wilcoxon-Hartzell (1931), als Randwinkel (contact angle) derjenige Winkel aufgefaßt, der von der Tangente zur Oberfläche der Flüssigkeit in dem Punkte, wo sich Luft, Flüssigkeit und festes Medium treffen, und der Tangente zu der festen Oberfläche in demselben Punkte, gebildet wird. Der Winkel liegt in der Flüssigkeit. Ist diese Winkel 180 (Alt-)Grade groß, so tritt weder Benetzung noch Ausbreitung ein. Hat er einen Wert zwischen 0 und 180° dann findet Benetzung statt, die um so größer ist und rascher vor sich geht, je näher der Randwinkel sich der Größe 0 nähert. Hat der Randwinkel einen Wert von 0°, so tritt sowohl Benetzung als auch Ausbreitung ein. Wäßrige Lösungen haben im allgemeinen einen Wert zwischen 0 und 180°.

Der Randwinkelsatz als einer der drei Capillargesetze sagt aus, daß eine Flüssigkeit bei Berührung mit einer festen Wand unter gleichen

Außenbedingungen stets denselben Winkel bildet (RHUMBLER, zit. bei HARTMANN 1947). Dieser Satz ist die theoretische Voraussetzung für die Realität unserer Messungen. Bleiben also 2 Partner eines Stofftrios (in unserem Falle das flüssige und gasförmige Medium) konstant, so ist der *Randwinkel ein Maß für die Benetzbarkeit des 3. Partners, der Haftfläche.* Als Haftfläche ist die Blattoberfläche anzusehen.

Die Messung des Randwinkels bietet dennoch, wie bereits oben angedeutet, eine Schwierigkeit. Die Erfahrung lehrt, daß es nicht nur *einen* Randwinkel, kurz den sog. „Sollrandwinkel", wie er auf Grund der Überlegungen der klassischen Schule vom Gleichgewicht in der physikalischen Chemie zu fordern wäre, gibt. Vielmehr tritt ein für jedes Stoffpaar mit Beteiligung des 3. Stoffraumes kennzeichnender Ruherandwinkelspielraum auf. Dessen in der Flüssigkeit gemessene Grenzwinkel werden als statische Vordrück- und Rückzugswinkel bezeichnet (v. EICHBORN 1944a). Die ältere Forschung sah den Grund in einem „chemischen Dreckeffekt". ADAM-JESSOP (1925) suchen die Ursache dieser Erscheinung, die als Hystereseeffekt des Randwinkels oder *Randlinienhysterese* bekannt ist, in einer „einfachen Reibung der Flüssigkeit auf der festen Oberfläche". Neuerdings hat v. EICHBORN in eingehenden Untersuchungen (1944a, b, 1949) gezeigt, daß solche mikrophysikalischen Oberflächenrauhigkeiten nicht zur Erklärung der Erscheinungen ausreichen. Er hat daher die Grundlagen einer molekularen Randwinkeltheorie aufgebaut. Danach entspricht der Skala stabiler Randwinkel eine ebenso stabile Skala örtlicher Dichteunterschiede der freien Grenzflächenenergie an der Randlinie. So wäre der Randwinkel, ähnlich einem Kristallwinkel, Ausdruck bestimmter molekularer Ordnung. Die Variabilität des mechanischen Gleichgewichtswinkels würde sich aus einem Stoffmittelzustand zwischen „fest" und „flüssig", einer Aggregationsmetastase im Sinne WO. OSTWALDS, erklären.

Die damit eintretende Meßunsicherheit liegt also weniger im Meßverfahren und der „Reinheit der Oberflächen" begründet, sondern in dem Wesen der Erscheinung des Flüssigkeitshaftens selber. Die Größe des Randwinkels ist mithin abhängig von der Vorgeschichte der Relativbewegung der Flüssigkeit. Winkeländerungen, die spontan oder auf Grund von mechanischen Erschütterungen auftreten, haben nichts mit einer echten Hysterese der Randwinkel zu tun.

Da es sich bei unseren Messungen jedoch nicht um „reine Oberflächen" im physikalisch-chemischen Sinne handelt, haben wir uns damit begnügt, den Vordrück- (advancing angle) und Rückzugs-(receding angle)winkel zu bestimmen und nach der von ADAM-JESSOP (1925) angegebenen Formel (1) den Gleichgewichtswinkel (Θ) zu errechnen.

$$\cos \Theta = \frac{\cos \Theta_a + \cos \Theta_r}{2}. \qquad \begin{matrix} \Theta_a = \text{Vordrückwinkel} \\ \Theta_r = \text{Rückzugswinkel} \end{matrix} \qquad (1)$$

Das gleiche Verfahren haben auch Wilcoxon-Hartzell (1925) bei Beobachtungen an zoologischen Objekten angewandt. Eine Vereinfachung der Rechnung läßt sich noch einführen. Wenn die Winkel zwischen 45 und 135° liegen, entstehen keine größeren Fehler bei der einfachen Rechnung (2):

$$\Theta = \frac{\Theta_a + \Theta_r}{2}. \qquad (2)$$

Methode.

In der Pflanzenschutzpraxis sind schon seit Jahrzehnten in Anlehnung an physikalische Arbeitsweisen (vgl. Schultze 1928) Methoden

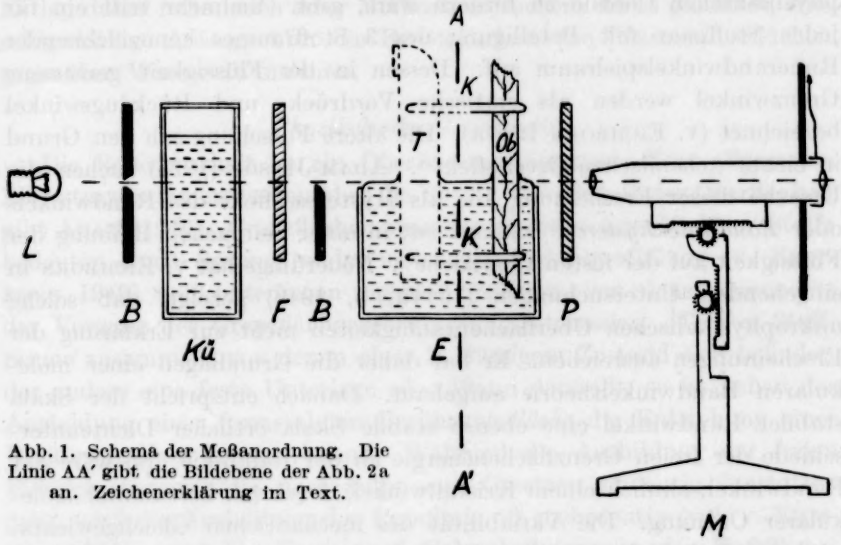

Abb. 1. Schema der Meßanordnung. Die Linie AA' gibt die Bildebene der Abb. 2a an. Zeichenerklärung im Text.

im Gebrauch, die es gestatten, die *Benetzungsfähigkeit* von Flüssigkeiten, insbesondere Spritzbrühen, zu bestimmen (Stellwaag 1924, Trappmann 1925, Kremp 1949). Für die größenmäßige Erfassung der *Benetzbarkeit* von Oberflächen liegen unseres Wissens in der biologischen Forschung nur Versuche an der Insektenkutikula vor (Wilcoxon-Hartzell 1925).

Entsprechend den physikalischen Methoden ließen sich zwei Wege bei der Messung der Benetzbarkeit biologischer Oberflächen einschlagen. Entweder konnten Tropfen auf die Oberfläche gebracht werden und an ihnen die Randwinkel direkt oder durch Ausmessen der Tropfengestalt bestimmt werden. Oder es ließen sich, entsprechend den Tauchplattenversuchen, die auftretenden Randwinkel bei Tauchbenetzung bestimmen. Es wurde der letztere Weg eingeschlagen, da er sich technisch leichter und in großem Umfang schneller durchführen läßt. Außerdem können zahlreiche Ablesungen an der gleichen Oberfläche, auf Ober- und Unterseite gleichzeitig, innerhalb kurzer Zeit vorgenommen werden.

Die Meßanordnung ist im einzelnen aus den Abb. 1 und 2 zu ersehen. Von einer hellen Lichtquelle (Mikroskopierlampe) wird ein breites Lichtbündel durch Blenden (*B*) auf das Objekt (*Ob*) gerichtet. In den Strahlengang sind ein Farbfilter (*F*), eine Kühlküvette (*Kü*), sowie ein Filterpolarisator von Zeiß Opton (*P*) eingeschaltet. Durch Drehen des Polarisators lassen sich unerwünschte Spiegelungen weitgehend ausschalten. Das Eintauchgefäß (*E*) stellt eine planparallele Glasküvette dar, die bis an den Rand mit Wasser gefüllt ist. In diese Küvette reicht der Tauchapparat (*T*) hinein, an dessen ausgreifendem Arm verkröpft zwei Klemmen (*K*) angebracht sind. Dieser Taucharm ist, ebenso wie

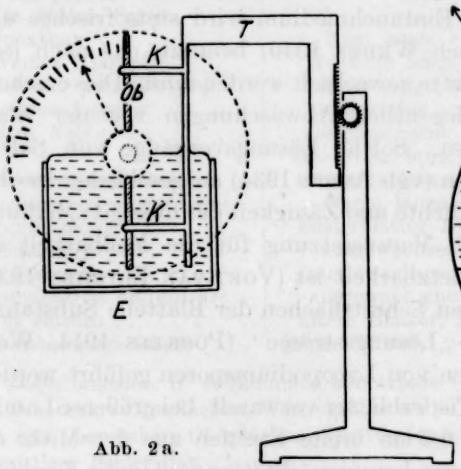

Abb. 2a.

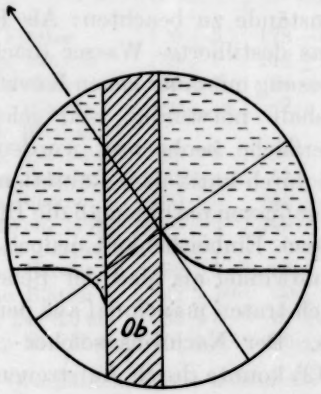

Abb. 2b.

Abb. 2a. Meßanordnung von vorne in der Ebene AA′ der Abb. 1.

Abb. 2b. Gesichtsfeld im Horizontalmikroskop während der Beobachtung. Das Fadenkreuz wird als Tangente am Meniskus angelegt, der durch die Flüssigkeit an der Blattoberfläche (*Ob*) gebildet wird.

das Eintauchgefäß (*E*) völlig erschütterungsfrei aufgestellt. Der Tauchapparat ist durch ein leichtgehendes Mikroskopgetriebe auf und ab beweglich. Zwischen die beiden Klemmen (*K*) wird das Objekt eingespannt. Sämtliche Metallteile, die mit Wasser in der Küvette in Berührung kommen, sind mit Unterwasserschutzfarbe („Integrol") gestrichen.

Vor der Taucheinrichtung ist ein Horizontalmikroskop (*M*) (Seibert-Wetzlar) aufgestellt, das in zwei Ebenen verstellbar und außerdem um eine senkrechte Achse drehbar ist, so daß alle Punkte des Raumes in die optische Ebene gebracht werden können. Auf dem waagerechten Tubus des Mikroskopes ist eine Teilkreisscheibe mit einer nach beiden Richtungen eingetragenen 180°-Einteilung angebracht. Die Kreisscheibe ist durch ein Bleilot justierbar. Im Gesichtsfeld des Okulars ist auf der Blende ein Fadenkreuz angebracht. Das Okular ist außen mit einem Zeiger justiert, der auf der Kreiseinteilung läuft. Im Gesichtsfeld des Mikroskopes ist das Objekt (*Ob*) umgekehrt, seitenverkehrt zu sehen (Abb. 2b). An dessen Oberflächen entstehen, entsprechend ihrer

Benetzbarkeit, Menisken, die nunmehr der Messung zugänglich sind. Das Fadenkreuz wird als Tangente angelegt und an der Winkeleinteilung der entsprechende Randwinkel abgelesen. Auf diese Weise können bei einer Einstellung gleichzeitig die Werte für Ober- und Unterseite (d.h. im Gesichtsfeld entsprechend rechts und links) ermittelt werden. Vordrück- und Rückzugswinkel lassen sich am gleichen Objekt beim Eintauch- bzw. Auftauchvorgang bestimmen. — Die gesamte Apparatur steht in einem temperaturkonstanten Raum bei $20 \pm 0{,}3^0$ C und einer Luftfeuchtigkeit von 80—84%.

Zur Erzielung möglichst reproduzierbarer Werte sind noch folgende Umstände zu beachten: Als Eintauchmedium wird stets frisches über Glas destilliertes Wasser (nach Weber 1949) benutzt, das nach jeder Messung mit einer neuen Küvette gewechselt werden muß. Dies erscheint deshalb notwendig, weil gelegentlich Abwaschungen von der Blattoberfläche beobachtet wurden. Solche Lösungsvorgänge von Salzen, die durch kutikuläre Rekretion (vgl. Arens 1934) ausgeschieden werden, beeinflussen naturgemäß die Dichte und Zähigkeit des flüssigen Mediums, dessen Einheitlichkeit jedoch Voraussetzung für die Meßbarkeit der Randwinkel als Maß der Benetzbarkeit ist (Voet-van Elteren 1937). Auch traten manchmal aus den Schnittflächen der Blatteile Substanzen aus. Der Nachweis solcher „Lösungsströme" (Pockels 1914, Wolf 1943) konnte durch Aufstreuen von Lycopodiumsporen geführt werden.

Zur Messung werden nun Fiederblätter verwandt, bei größerer Lamina einheitlich etwa 5 cm lange, 0,5 cm breite Streifen aus der Mitte des Blattes seitlich vom Hauptnerven herausgeschnitten und in die Klemmen (K) des Tauchapparates eingebracht. Sehr wesentlich ist, daß alle zu messenden Flächen völlig unberührt bleiben. Die Messung kann sofort nach Eintauchen in der beschriebenen Weise beginnen.

Eine gewisse Justierung der Apparatur kann durch Eintauchen eines dünnen, mit Paraffin vom Smp. 54—55° C überzogenen Glasstabes erfolgen. Nach Angabe von G. Meyer (Landolt-Börnstein 1927) muß der Randwinkel dann bei 10° C 104 Grad 34 Minuten betragen. Die Ablesegenauigkeit ist bei unserer Apparatur 1—2 Winkelgrade.

Mit der von Haller (1931) beschriebenen Anordnung ließ sich durch Einstellen des Eintauchgefäßes in eine weitere planparallele Küvette, die mit einer stark lichtbrechenden Flüssigkeit, z. B. Xylol mit Methylbenzoat, gefüllt war, die Sichtbarkeit der Benetzung verbessern. Jedoch reichte im allgemeinen die normale Anordnung durchaus hin. Nur zur Sichtbarmachung sehr dünner Benetzungsfilme empfiehlt sich die Verwendung der Hallerschen Anordnung.

Erste Messungen.

Die Brauchbarkeit der Methode konnte in zahlreichen Messungen im Laufe der letzten Jahre erprobt werden. Nachstehend sind einige Werte tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle 1. *Benetzbarkeit von Blattoberflächen* (in Grad Ruherandwinkel).

Art	Entwicklungszustand	Oberseite	Unterseite
Triticum vulgare	10 Tage alte Keimpflanzen	160 ± 2	160 ± 2
Avena sativa	14 Tage alte Keimpflanzen	145 ± 3	145 ± 3
Zea Mays	3 Wochen alte Keimpflanzen	138 ± 3	138 ± 3
Sinapis alba	3 Wochen alte Keimpflanzen		
	Keimblätter	52 ± 3	76 ± 5
Sinapis alba	Primärblätter	32 ± 2	80 ± 5
Nicotiana tabacum	5 Wochen alte Pflanzen	52 ± 1	84 ± 5
Nicotiana Lycopersicum	6 Wochen alte Pflanzen	66 ± 5	84 ± 2
Zebrina popusi	Blätter	45 ± 0	45 ± 0
Pirus Malus, Sorte:			
Jonathan	2 cm lange Blätter	120 ± 5	128 ± 6
Weißer Klarapfel	1—2 cm lange Blätter	138 ± 7	142 ± 2
Schöner von Boskoop	3 cm lange Blätter	61 ± 8	86 ± 5
Humulus Lupulus	ausgewachsene Blätter	80 ± 14	83 ± 11
Hedera Helix	ausgewachsene Blätter,		
	15—16 cm lang, glänzend	52 ± 9	54 ± 6
Phragmites communis	ausgewachsene Blätter	31 ± 4	51 ± 2
Narcissus pseudonarcissus	20 cm lange Blätter	153 ± 6	149 ± 4
Lupinus albus	Fiederblätter 10 cm lang	158 ± 3	143 ± 9
Helleborus viridis	ausgewachsene Blätter	38 ± 7	35 ± 4
Iris germanica	ausgewachsene Blätter	92 ± 5	92 ± 5
Rhododendron catawbiense	ausgewachsene Blätter	42 ± 10	50 ± 9
Ficus elastica	ältere Blätter, 24—26 cm	39 ± 8	47 ± 6
Nelumbium speciosum	junge Blätter, ⌀ 10—12 cm	151 ± 4	90 ± 5

Dabei bedeuten: 0° vollkommen benetzbare Oberflächen, Werte kleiner als 90° gut benetzbare Oberflächen, Werte größer als 90 schlecht benetzbare Oberflächen, 180 nicht benetzbare Oberflächen. Die Werte stellen Mittel aus 10 Einzelmessungen ± mittlere Fehler dar.

Es zeigt sich bei der Durchführung der Beobachtungen, daß auf Blattoberflächen der gleichen Art, im gleichen Alter und Entwicklungszustand die Benetzbarkeit gegenüber Wasser in engen Grenzen schwankt. Wesentlich ist jedoch, daß stets der gleiche Ausschnitt der Blattlamina zur Messung verwandt wird. Die angegebene Streuung ist durchaus real. Auf einer Blattspreite ist nämlich die Benetzbarkeit nicht einheitlich. Es ließ sich bei Reihenmessungen mit zahlreichen Ablesungen über der gleichen Spreite zeigen, daß die Größe der Benetzbarkeit sich gesetzlich ändert. Und zwar ist sie über den Interkostalräumen relativ niedriger, während sie insbesondere über den stärkeren Blattnerven deutlich und regelmäßig ansteigt. Dies stimmt mit den Angaben von Krause (1935) gut überein, die bei zahlreichen Arten beobachtete, daß die Epidermiszellen über den Blattnerven bevorzugte Orte für den Wassereintritt sein können. Entsprechende Angaben werden von Liebig (1932) und nach fluoreszensoptischen Beobachtungen von Steubing (1949) gemacht. Als Beispiel für unsere Messungen geben wir eine graphische Darstellung von Messungen an einem *Hydrangea*-Blatt

(Abb. 3). Stellen hoher Benetzbarkeit zeigen sich in den Kurven durch ausgeprägte Maxima an. Sie liegen mit großer Regelmäßigkeit über den Gefäßsträngen.

Auffallend ist weiterhin die Tatsache, daß die Benetzbarkeit auf der Unterseite dorsiventraler Blätter fast immer geringer gegenüber den entsprechenden Orten auf der Oberseite ist. — Eine Beziehung zwischen Kutikuladicke und Größe der Benetzbarkeit konnte bisher

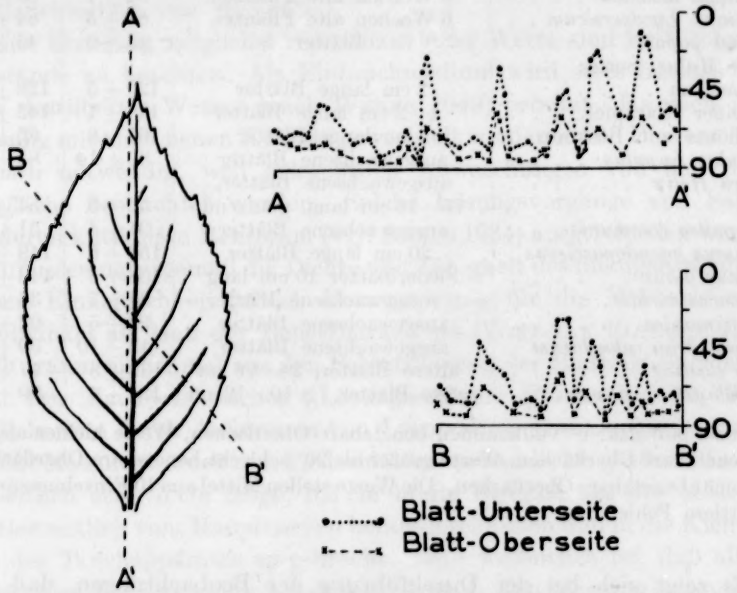

Abb. 3. Benetzbarkeit eines *Hydrangea*-Blattes. Die Benetzbarkeit der Profile AA' und BB' ist graphisch dargestellt.

nicht gefunden werden. In diesem Zusammenhang sei an die Feststellung von Kamp (1930) erinnert, daß zwischen der Größe der kutikulären Transpiration und der Dickenausbildung der Kutikula keine Proportionalität besteht. Der „Verwitterungszustand" der Kutikula sowie die Natur und Struktur der Kutikulaauflagerungen scheint jedoch den Grad der Benetzbarkeit entscheidend zu beeinflussen. Dies wäre aus der Tatsache, daß es sich bei der Benetzbarkeit um ein reines Oberflächenphänomen handelt, sehr wohl verständlich. — Über den Einfluß der Epidermis- und Kutikulanatur auf die Größe der Benetzbarkeit, sowie deren jahreszeitliche Änderungen wird später berichtet werden.

Die erste Überschau der in Tabelle 1 wiedergegebenen Werte läßt neben Ausblicken auf ökologische Gesetzlichkeiten auch Schlüsse auf wesentlich angewandt-botanische Fragen zu. Vergleicht man die Randwinkel der Blätter von Senf und jungen Weizenpflanzen, so liegt der Schluß nahe, die selektive Wirkung gewisser Herbizide durchaus in einer unterschiedlichen Benetzbarkeit zu suchen.

Auch die Erfahrung, daß *Sinapis* besonders wirksam erst bekämpft werden kann, wenn die Primärblätter entwickelt sind, findet eine einleuchtende Erklärung, da deren Benetzbarkeit wiederum größer ist als die der Kotyledonen.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, mit Hilfe von Randwinkelmessungen auf Blattoberflächen den Grad der Benetzbarkeit größenmäßig anzugeben. Je größer der Randwinkel, um so geringer die Benetzbarkeit. Erste Messungen zeigen, daß die Unterseite dorsiventraler Blätter im allgemeinen geringer benetzbar ist als die Oberseite. Die Benetzbarkeit auf dem gleichen Blatt zeigt Maxima über den Blattnerven.

Anmerkung bei der Korrektur: Während der Drucklegung erst ist mir eine Arbeit von G. E. Fogg [Proc. roy. Soc. (Lond.) ser. B, **134**, 503 (1947)] zugänglich geworden, auf die mich Herr Dr. O. Härtel, Graz, aufmerksam machte. Fogg kommt durch Ermittlung des Vordrückwinkels an Tropfen zu ähnlichen Ergebnissen wie vorstehende Untersuchung. Eine Diskussion der beiden Methoden erfolgt an anderer Stelle.

Literatur.

Adam, N. K.: The physics and chemistry of surfaces. London 1946. — Adam, N. K., and G. Jessop: Angles of contact and polarity of solid surfaces. J. chem. Soc. Lond. **127**, 1863 (1925). — Arens, K.: Die kutikuläre Exkretion des Laubblattes. Jb. Bot. **80**, 248 (1934). — Awano, S.: Über die Benetzbarkeit der Blätter. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo **27**, 1 (1909/11). — Clee, D. A.: The morphology and anatomy of *Pellia epiphylla* considered in relation to the mechanism of absorption and conduction of water. Ann. of Bot., N. s. **3**, 105 (1939). — Delf, E. M.: Transpiration and behaviour of stomata in halophytes. Ann. of Bot. **25**, 485 (1911). — Eichborn, J. L. v.: Zur Frage des gegenseitigen Haftens räumlich nicht mischbarer Stoffe. I. Probleme der Randwinkel, insbesondere von Flüssigkeiten an Festoberflächen. Kolloid-Z. **107**, 107 (1944a). — Zur Frage der gegenseitigen Haftens räumlich nicht mischbarer Stoffe. II. Haftspuren im Hauchbild und Randlinienhysterese von Wassertropfen auf Quecksilberoberflächen. Kolloid-Z. **109**. 62 (1944b). — Theorie der kapillaren Flüssigkeitsformen und ihrer Randlinien seit 150 Jahren. Kolloid-Z. **112**, 141 (1949). — Haller, W.: Eine Methode zur Sichtbarmachung der Benetzung. Kolloid-Z. **55**, 1 (1931). — Isaac, I.: The structure of *Anthoceros laevis* in relation to its wart supply. Ann. of Bot., N. s. **5**, 339 (1941). — Kamp, H.: Untersuchungen über Kutikularbau und kutikuläre Transpiration von Blättern. Jb. Bot. **72**, 403 (1930). — Knothe, E.: Vergleichende Anatomie der unbenetzbaren Blätter. Diss. Heidelberg 1902. — Krause, H.: Beiträge zur Kenntnis der Wasseraufnahme durch oberirdische Pflanzenorgane. Österr. bot. Z. **84**, 241 (1935). — Kremp, R.: Pflanzenschutztechnik auf alten und neuen Wegen. Agrarwissenschaft und Agrarpolitik, H. 8. Köln-Opladen 1949. — Liebig, H.: Über die Funktion der Ligula von *Isoëtes lacustris*. Flora (Jena), N. F. **26**, 111 (1932). — Linsbauer, K.: Die Epidermis. In Handbuch Pflanzenanatomie, Abt. 1, Teil 2. Berlin 1930. — Linskens, H. F.: Niederschlagsmessungen unter einem Apfelbaum während einer Vegetationsperiode. Meteor. Rdsch. (im Druck). — McConaha, M.: Ventral surface specializations of *Coenocephalum conicum*. Amer. J. Bot. **26**, 271 (1939). — Pockels, A.: Über Randwinkel und Ausbreitung von

Flüssigkeiten auf festen Körpern. Physik. Z. **15**, 39 (1914). — Rhumbler: Das Protoplasma als physikalisches System. Erg. Physiol. **14** (1914). Zit. nach Hartmann, Allgemeine Biologie 1947. — Schrödter: Taumenge und Benetzungsdauer. Biol. Zbl. **69**, 42 (1950). — Schultze, K.: Methodik der Bestimmung der Kapillarität. In Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Bd. III, Teil A, 1. Hälfte, S. 1462 ff. 1928. — Stellwaag, F.: Die Benetzungsfähigkeit flüssiger Pflanzenschutzmittel und ihre direkte Meßbarkeit nach einem neuen Verfahren. Z. angew. Entomol. **10**, 163 (1924). — Steubing, L.: Beiträge zur Tauwasseraufnahme höherer Pflanzen. Biol. Zbl. **68**, 252 (1949). — Trappmann, W.: Methoden zur Prüfung von Pflanzenschutzmitteln. I. Benetzungsfähigkeit. Arb. biol. Reichsanstalt Land- u. Forstw. **14**, 256 (1925). — Voet, A., et J. F. van Elteren: The wetting characteristics of a surface. Rec. Trav. chim. Pays-Bas **56**, 923 (1937). — Weber, H. H.: Ein Apparat, um Wasser in einer Stufe auf H = 2 10^{-6} zu destillieren. Z. Naturforschg. **4b**, 124 (1949). — Wetzel, K.: Die Wasseraufnahme der höheren Pflanzen gemäßigter Klimate durch oberirdische Organe. Flora (Jena), N.F. **17**, 221 (1924). — Wilcoxon, F., and A. Hartzell: Some factors affecting the efficiency of contact insecticides. I. Surface forces as related to wetting and tracheal penetration. Contr. Boyce Thompson Inst. **3**, 1 (1931). — Wolf, L.: Theoretische Chemie, Teil 3. Leipzig 1943. — Ziegenspeck, H.: Zur physikalischen Chemie unbenetzbarer besonders bewachster Blätter. Kolloid-Z. **100**, 401 (1942).

Dr. H. F. Linskens, Köln, Botan. Institut der Universität.

Planta, Bd. 38, S. 601—602 (1950.)

Kurze Mitteilung.

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg.

CHROMATOGRAPHIE DER BLATTFARBSTOFFE. (EINE ERWIDERUNG.)

Von

A. SEYBOLD.

(Eingegangen am 12. April 1950.)

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung zieht K. WENDEL (1950) die Brauchbarkeit der chromatographischen Methode, wie wir sie seit 1933 zur Trennung der Blattfarbstoffe verwandten, in Zweifel. Diese kommen vor allem in folgenden Sätzen zum Ausdruck, „daß mit der Methode der chromatographischen Analyse an Zucker die Arbeitsweise nach STROTT (1938) *keinesfalls verbessert, wohl aber komplizierter* gestaltet worden ist". „Es besteht kein Zweifel, daß die einfache chromatographische Methode nach STROTT (1938) bei Beachtung der von STOCKER (1939) angeführten Maßnahmen, *soweit es sich um die Erfassung des Gesamtchlorophylls handelt*, befriedigen kann. Andererseits entsprachen die von SEYBOLD und EGLE (1937, 1939, 1940, 1942) immer wieder als überlegen gegenübergestellten Methoden an Puderzucker nicht unseren Anforderungen: es ergaben sich für die beiden Farbstoffe auffallend höhere Absorptionsbänder, was auf keine einwandfreie Trennung schließen ließ." Ohne auf Einzelheiten einzugehen, soll im Interesse der Forschung zu den unrichtigen Behauptungen kurz Stellung genommen werden. Wenn WENDEL hervorhebt, daß, „*soweit es sich um die Erfassung des Gesamtchlorophylls handelt*", die einfache chromatographische Methode nach STROTT befriedigen kann, so ist das von mir nie bestritten worden, da wir in allen Fällen die beiden Chlorophyllkomponenten quantitativ trennten und wir uns mit der Erfassung des Gesamtchlorophylls *nicht* begnügten. Daß wir die vier Farbstoffkomponenten der Laubblätter, insbesondere Chlorophyll a und b, quantitativ trennen können, ist bislang von keiner Seite bestritten worden. Welcher Befund hätte dazu auch Anlaß geben sollen?! Wenn WENDEL der Ansicht ist, daß wir „keine einwandfreie Trennung" durchführten (was er mit auffallend hohen Absorptionsbändern der beiden Chlorophylle meint, ist mir unverständlich), so hat er für diese Behauptung keinen einzigen Beweis erbracht. Hätte WENDEL nur einige unserer zahlreichen veröffentlichten Absorptionskurven und Absorptionsspektren (z. B. SEYBOLD und WEISSWEILER 1943, Fig. 4, 6—8; EGLE 1939, Abb. 1 und Tabelle 3) beachtet, so wäre er wohl kaum zu seiner Behauptung gekommen.

Für den Sachkenner ist WENDELS Behauptung mindestens befremdend, daß von uns die Arbeitsweise von STROTT „*keinesfalls verbessert, wohl aber komplizierter* gestaltet worden ist". STROTT wurde seinerzeit in meinem Institut in die chromatographische Methode, wie wir sie gebrauchten, eingeführt und hat diese hernach in manchem abgeändert, vor allem an Stelle des Zuckers Stärkemehl verwandt (STROTT 1938; STOCKER 1939). Die mit Fehlern behafteten Analysendaten STROTTS sind von mir bereits diskutiert worden (SEYBOLD 1939).

Wenn wir an mehreren Stellen Bedenken gegen die Anwendung von Stärke bei der Chromatographie der Blattfarbstoffe vorgebracht haben, so hat dies seine Gründe; nicht zuletzt eben *den*, daß mehrere Untersuchungen anderer Autoren

mit Stärke als Adsorptionsmittel fehlerhafte Resultate gezeitigt haben. Daß man mit Puderzucker auch unzureichend chromatographieren kann, ergibt sich ebenfalls aus der Literatur. Wenn WENDEL die Auffassung vertritt, daß für die Chromatographie der Chlorophylle Stärke gegenüber Zucker „durchaus mehr als gleichwertig" ist (das Zitat ist nicht auffindbar!), so muß er mindestens noch den Beweis hierfür erbringen, daß man an Zucker nicht einwandfrei die beiden Chlorophyllkomponenten trennen könne, was WENDEL unseren Untersuchungen unterstellt. Hie Zucker — hie Stärke! erscheint mir ein überflüssiger Streit. Wesentlich ist, daß einwandfrei chromatographiert wird! Wer die Chromatographie beherrscht, wird mit beiden, ja noch mit vielen anderen Adsorptionsmitteln Chlorophyll a und b quantitativ trennen können (EGLE 1944, S. 96).

Wenn es WENDEL aufrechterhält, daß tägliche Chlorophyllschwankungen im Sinne von BUKATSCH vorhanden sind und diese mittels Chromatographie ermittelt werden, kann ich meine vorgebrachten Bedenken (SEYBOLD 1941) nicht aufgeben. Das ist das Wesentliche der Streitfrage und nicht die Wahl des Adsorptionsmittels. Daß man bei der quantitativen Bestimmung der Blattfarbstoffe auch noch andere Fehler als chromatographische machen kann, ist eine andere Sache!

Literatur.

EGLE, K.: Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl. Abh. 1, 1939. — Bot. Archiv **45**, 93 (1944). — SEYBOLD, A.: Z. Bot. **33**, 229 (1939). — Bot. Archiv **43**, 71 (1941). — SEYBOLD, A., u. A. WEISSWEILER: Bot. Archiv **44**, 456 (1943). — STOCKER, O.: Z. Bot. **34**, 187 (1939). — STROTT, A.: Jb. Bot. **86**, 1 (1938). — WENDEL, K.: Planta (Berl.) **37**, 604 (1950).

Planta, Bd. 38, S. 603—604 (1950).

Kurze Mitteilung.

Aus dem Gärungsphysiologisch-chemischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Abteilung C. H. Boehringer Sohn in Ingelheim a. Rh.

CHROMATOGRAPHIE DER BLATTFARBSTOFFE.
(STELLUNGNAHME ZU VORSTEHENDER ERWIDERUNG.)

Von

KURT WENDEL.

(Eingegangen am 30. August 1950.)

Es bedarf zunächst der Klarstellung, daß ich mich nur deshalb auf die chromatographische Analyse von (a + b) beschränkte, weil die Untersuchung des Komponentenverhältnisses a/b *schon damals* für eine weitere Arbeit vorgesehen war (Diss. STEUER[1]); hiermit ist die Vermutung SEYBOLDS, daß ich mich mit der Erfassung von (a + b) begnügen mußte, hinfällig geworden. Daß man tatsächlich mit beiden Methoden zu vergleichenden Ergebnissen kommen kann, ist bereits durch BUKATSCH (1942) gezeigt worden; ich hätte mich mit dieser Tatsache zufrieden geben können, hätten wir uns damals, angesichts des zeitraubenden, und *schon deswegen für unsere Zwecke ungeeigneten* SEYBOLD-EGLE-*Verfahrens* (weiterhin S-E-Verf. genannt) nicht ungewöhnlich lange mit den beiden Methoden, sowohl hinsichtlich der Einfachheit ihrer Handhabe, als auch der spektroskopischen Reinheit der gewonnenen Adsorbate befaßt. Sicher ist, *daß Puderzucker, infolge seiner qualitativen Unterschiede, seines verschiedenen Körnungsgrades und schwankenden Wassergehaltes, sowie seiner Hygroskopizität die Chromatographie beeinträchtigen kann*, und durch solche Nachteile, die schon das Adsorbens in sich birgt, abgesehen von der für Serienanalysen zeitlich untragbaren vorherigen Abtrennung der Xanthophyllanteile (SEYBOLD 1935, ...,,da größere Mengen X die saubere Trennung von a und b vereiteln ...") *nicht nur kompliziert, sondern subjektiv* erscheint; das schließt nicht aus, daß sie sich in den Händen SEYBOLDS bewährt haben *kann*. — „Hie Stärke — Hie Zucker" erscheint mir *kein* überflüssiger Streit, weil die Stärkemethode, bei Einhaltung unseres Verfahrens, solche Fehlermöglichkeiten nahezu ausschließt, schnell arbeitet, und sich in der Hand eines jeden sofort als brauchbar erweisen wird; daß „einwandfrei" chromatographiert wird, ist die Voraussetzung für jede Chromatographie überhaupt!

Es ist von mir niemals diskutiert worden, ob man im Botanischen Institut Prof. SEYBOLDS die vier Farbkomponenten quantitativ trennen kann oder nicht. Wenn man die aufgezeigten Nachteile, die die S-E-Methode *für unsere Zwecke nicht dienlich macht*, dennoch so wichtig nimmt, daß die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse bedroht erscheinen, so liegt das nicht in unserer Absicht. Sollte auch die Stärkemethode fehlerhafte Ergebnisse gezeigt haben, so sehe ich die Ursache dafür in der starken Anlehnung an die STROTTsche Arbeitsweise, ohne Beachtung der von STOCKER (1939) angeführten Maßnahmen; wenn aber, wie SEYBOLD anführt, mit Puderzucker „auch unzureichend chromatographiert wurde", so lag das zum Teil an den *ungeeigneten* Adsorbentien, den variablen Zuckerqualitäten, die an sich schon Fehlermöglichkeiten bedingen können — ein Umstand, mit welchem wir bei der Stärketrennung nicht zu rechnen haben. Möglicherweise ergibt sich auch hieraus die Ursache für die unsichere Reinheit eluierter Adsorbate; die Angabe von PIRSCHLE (1942) weist auf die gleiche Unsicherheit der an Puder-

[1] Dissertation STEUER, S. 130: „Eine Prüfung, wieweit bei der angewandten Methode, insbesondere bei der Adsorption an Puderzucker Verluste auftreten, mußte unterbleiben, da reine Präparate von a und b nicht zur Verfügung standen."

zucker nach dem S-E-Verf. getrennten Komponenten hinsichtlich ihrer Reinheit hin — ein Beweis, daß man *auch dort* diesbezüglich *nicht* damit zurechtkam.

Ich habe zur Gewinnung von Reinpräparaten (a + b)-haltige Benzin-Benzolgemische 1. nach dem S-E-Verf. chromatographiert und die eluierten Adsorbate spektroskopisch geprüft. Ich habe 2. in 26 Versuchsserien gefunden, daß sich a) Benzin-Benzol 6:1, b) Benzin-Benzol 9:1, c) reines Benzin, d) reiner Petroläther *in genannter Reihenfolge* am besten bewährt. Darüber hinaus mußte ich feststellen, daß trotz der vorausgehenden Hauptabtrennung der X-Anteile, es erschwert bleibt, den X-Rest von der a-Zone abzutrennen, ein Umstand, dem SEYBOLD mit der reinen Benzoltrennung begegnet, und mich 3. veranlaßte, die a-Zone hinabzutreiben, um die anfangs unscharfe a/X-Trennung, *selbst bei a-Verlust*, auszuwaschen. Die spektroskopische Prüfung aller ätherischer Eluate wurde in unserem Laboratorium und im Organischen Institut der Technischen Hochschule München durchgeführt (Bezugsspektrum Hg-Linie 623 mμ, Li-Linien 600, 640, 670, 690 mμ) und ergab, im Vergleich zu eingeschmolzenen reinen Präparaten von a und b, sowie deren Phäophytinen für die nach Verfahren 1 und 2 gewonnenen Adsorbate:

1. Beide Chlorophylle zeigen *auffallend höhere* Absorptionslinien: a-Eluat 665—675 mμ, 435 mμ; b-Eluat 665—680 mμ, 645 mμ, 437 mμ.

2. Die Hauptabsorption des a-Eluats *bleibt* beim Vertauschen der Küvette gegen die Küvette mit b-Eluat als Nebenabsorption erhalten.

3. Der Vergleich b-Eluat mit dem von Herrn Dr. MITTENZWEI, Organisches Institut der Technischen Hochschule, eingeschmolzenen Phäophytin b gab Anlaß zur Vermutung, daß genannte höhere Nebenabsorption des b-Eluats eine Phäophytin-b-Absorption darstellen könnte.

4. Die nach *Verfahren 3* erlangten Adsorbate beweisen zu der auch hier höherliegenden Absorption a (660—670 mμ, 430 mμ) die spektroskopische Reinheit des b-Eluats (645 mμ, 453 mμ, Nichtabsorption bis 453 mμ), und somit die Brauchbarkeit der dort verwandten Entwicklungsgemische. Die nochmalige Chromatographie des b-Eluats mit Nebenabsorption (aus 2) erbrachte ein als spektroskopisch rein befundenes b-Adsorbat, eine schwach feststellbare, abwandernde X-Zone, und zuletzt ein aus b ausgewaschenes a-Adsorbat; die unter 3. erwähnte Vermutung entsprach somit *nicht* den Tatsachen.

Angesichts dieser Erfahrungen erkannten wir den Wert unserer verbesserten Stärkechromatographie, *deren Einfachheit und Vorteile gerade für Serienanalysen bisher nicht übertroffen worden sind.* Sollte sie fehlerhaft sein, so wäre es um so erstaunlicher, zu *so einwandfreien Ergebnissen zu kommen:* sie wurde durch BUKATSCH Herrn Geheimrat Prof. FISCHER persönlich vorgeführt; die gelieferten Fraktionen wurden erneut im Organisch-chemischen Institut geprüft und *spektroskopisch rein sowie frei von Zersetzungsprodukten gefunden! — Die Methode fand Beifall*, was schon daraus hervorgeht, daß sie von Herrn Dr. MITTENZWEI im selben Institut, *so auch* zur Chromatographie des Purpurbakterienpigments, *durch- und eingeführt wurde.* Nach meinen Darlegungen dürfte die Behauptung betreffend der Kompliziertheit des S-E-Verf. *gegenüber unserer chromatographischen Analyse* zurecht bestehen. Die von SEYBOLD von Anfang an bestrittenen kurzfristigen Pigmentschwankungen sind inzwischen auch von anderen Autoren beobachtet worden und *nachweisbar.* Darüber zu diskutieren ist erst nach Vorlage meiner diesbezüglichen Ergebnisse am Platze und hier nicht die Aufgabe. Die von SEYBOLD vorgebrachten Bedenken sind durch die hier zitierten Arbeiten BUKATSCHS (1942) und WENDELS (1948, 1950) längst hinfällig geworden.

Literatur.

BUKATSCH, F.: Z. Naturwiss. **8**, 79 (1942). — PIRSCHLE, K.: Z. Abstammgslehre **80** 126 (1942). — SEYBOLD, A.: Planta (Berl.) **37**, 604 (1950). — STOCKER, O.: Z. Bot. **34**, 187 (1939). — STROTT, A.: Jb. Bot. **86**, 1 (1938). — WENDEL, K.: Planta (Berl.) **36**, 71 (1948); **37**, 604 (1950).

Aufnahmebedingungen.

I. Sachliche Anforderungen.

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen.

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. **Die Abbildungsvorlagen sind getrennt vom Text und die Unterschriften auf besonderem Blatt einzuliefern.** Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zur Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und sprachlich gut geschrieben sein. Überflüssige Fremdwörter sind zu vermeiden. Verfassernamen sind mit großen Buchstaben zu schreiben oder gerade zu unterstreichen, lateinische Pflanzen- und Tiernamen sind gewellt zu unterstreichen. *Literaturhinweise* sind nicht durch Anmerkungen unter dem Text, sondern in diesem mit dem Namen des Verfassers, der Nummer der Arbeit im Literaturverzeichnis oder der Jahreszahl des Erscheinens und der Seitenzahl anzuführen (also z. B. MUELLER 1931, S. 608). Am Schluß der Arbeit sind die angeführten Veröffentlichungen in einem Literaturverzeichnis alphabetisch nach Verfassernamen geordnet, zusammenzustellen, wobei Zeitschriftenaufsätze mit Titel, Angabe von Band, Jahreszahl und Seite, Bücher mit Titel, Verlagsort und Jahreszahl anzuführen sind. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Ergebnisse gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden[1].

6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Kurze aber erschöpfende Figurenunterschrift erübrigt nochmalige Beschreibung im Text. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur *ein* gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist im allgemeinen die *doppelte* Darstellung in Tabelle *und* Kurve. *Farbige* Bilder können nur in seltenen Ausnahmefällen Aufnahme finden, auch wenn sie wichtig sind. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.

7. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

8. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen zwecks Erweckung des Anscheins größerer Kürze ist unzulässig.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Verfasser in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

---

[1] Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

Handbuch der experimentellen Pharmakologie

Begründet von **A. Heffter**

Ergänzungswerk

Herausgegeben von

W. Heubner
Professor der Pharmakologie
an der Universität Berlin

und

J. Schüller
Professor der Pharmakologie
an der Universität Köln

Vor kurzem erschien der zehnte Band

Die Pharmakologie anorganischer Anionen

Die Hofmeistersche Reihe

Von

Professor Dr. **Oskar Eichler**
Direktor des Pharmakologischen Institutes der ehem. Universität Breslau,
z. Z. Heidelberg, Chirurgische Klinik

Mit 94 Abbildungen. XX, 1206 Seiten. 1950. DMark 186.—

Inhaltsübersicht:

Vorkommen. — Chemie. — Komplexverbindungen. — Physikalische Chemie. — Katalyse, Fermente und Fermentsysteme. — Wirkung bei Einzellern. — Beeinflussung von Pflanzen und pflanzlichen Geweben. — Vergiftungsverlauf und Dosierungen. — Aufnahme der Anionen in den Organismus. — Ausscheidung. — Beeinflussung spezieller Organe und Organsysteme durch Anionen. — Mangelhafte und übermäßige Anwesenheit von Chlorid in Nahrung und Organismus. — Mangel und Überschuß an Phosphat. — Chronische Vergiftung mit Fluoriden. — Gegengiftwirkungen. — Abschluß. — Autorenverzeichnis. Sachverzeichnis.

Chemie der Beta-Dicarbonyl-Verbindungen

Von

Hans Henecka
Dr. phil. nat.

Mit 10 Abbildungen. VI, 409 Seiten. 1950

DMark 49.60; Ganzleinen DMark 52.60

(Organische Chemie in Einzeldarstellungen. Herausgegeben von Hellmut Bredereck und Eugen Müller. Band 4.)

Springer-Verlag / Berlin · Göttingen · Heidelberg

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.